

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

Potencial do óleo essencial de capim-camelô (*Cymbopogon schoenanthus*),
BISFP, Timorex Gold® e Trichoderma sc.® no controle dos patógenos
Colletotrichum truncatum e *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (*Glycine max*) via
tratamento de sementes

Mariana Colli

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

Piracicaba
2022

Mariana Colli
Engenheira Agrônoma

Potencial do óleo essencial de capim-camelo (*Cymbopogon schoenanthus*), BISFP,
Timorex Gold®, e Trichodermil sc.® no controle dos patógenos *Colletotrichum*
truncatum e *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (*Glycine max*) via tratamento de sementes

Orientador:
Prof. Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

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

Piracicaba
2022

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

Colli, Mariana

Potencial do óleo essencial de capim-camelo (*Cymbopogon schoenanthus*), BISFP, Timorex Gold®, e Trichodermil sc.® no controle dos patógenos *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (*Glycine max*) via tratamento de sementes / Mariana Colli. - - Piracicaba 2022

73 p.

Dissertação (Mestrado) - - USP / Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

1. Controle alternativo 2. Controle biológico 3. Bioinsumos 4. Óleos essenciais 5. Fitopatógenos 7. Crescimento micelial 8. Fitotoxicidade 9. Tratamento de sementes I. Título

Aos meus queridos e amados pais Alexandre Augusto Colli (*in memoriam*) e Maria Aparecida Lucato por toda a força e apoio durante esta trajetória; ao meu irmão Alexandre Colli pelo companheirismo e cumplicidade; ao meu noivo e parceiro Rafael Eckhardt Souza.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Alexandre Augusto Colli (*in memoriam*) e Maria Aparecida Lucato pelo apoio, compreensão, amor, dedicação e companheirismo constantes nos momentos de dificuldades, conquistas e alegrias.

Ao meu parceiro, Rafael Eckhardt Souza, pelo companheirismo, incentivo e amizade, pois acredito que sem ele seria muito difícil vencer esse desafio.

Ao meu irmão Alexandre Colli por sempre acreditar em mim, pela amizade e carinho.

Ao meu tio e padrinho Fernando Lucato (*in memoriam*) por sempre torcer por mim.

À toda minha família pela confiança e amor dedicados a mim.

Aos meus amigos de sempre Raquel Benato, Laura Botelho, Tathiane Ungari, Gustavo Righeto, Lucas Ruzene, João Paulo Faria.

À Eliane Benato, pelo carinho e pelos conselhos.

À república BAO, minha segunda família que sempre me apoiou e acreditou em mim.

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia do Parasitismo: Daniele Fontana, Abel Torres, Ruan Navarro, Samuel de Paula, Sabrina Holz, Janaina, Nathalia e Ana Galesi que além de uma incrível equipe de pesquisa, são como uma verdadeira família.

À Maria Heloísa Duarte de Moraes pela amizade, carinho, parceria, paciência e conhecimento transmitidos para o andamento e conclusão do projeto.

Ao Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati pelo carinho, atenção, dedicação e orientação para o bom andamento das atividades de pesquisa, e por aceitar-me em sua equipe, permitindo assim, que eu pudesse concluir esta trajetória.

Aos professores da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” que contribuíram com minha formação profissional desde a graduação, e que demonstram um grande carinho e amizade que extrapolam os portões da instituição.

Ao programa de Pós Graduação em Fitopatologia, pela disponibilidade e empenho em atender-me sempre que necessitei a este recorrer.

Sou muito grata pelo carinho e atenção com o qual sempre fui recebida na Secretaria do Programa de Pós Graduação em Fitopatologia pela Fabiana. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ pela concessão da bolsa de mestrado. À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” e todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu alcançasse mais esta vitória. Muito obrigada!!!

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1. Cultura da soja	15
2.2. Sementes	15
2.3. <i>Colletotrichum truncatum</i>	16
2.4. <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	19
2.5. Controle alternativo	21
2.5.1 Bioinsumos	22
2.6. Óleo essencial de capim-camelo (<i>Cymbopogon schoenanthus</i>)	23
2.7. BISFP	23
2.8. Timorex Gold®	24
2.9. Trichodermil sc.® (<i>Trichoderma harzianum</i> CEPA ESALQ 1306)	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1. Local	27
3.2. Obtenção	27
3.2.1. Material vegetal	27
3.2.2. Isolados fitopatogênicos	27
3.2.3. Potenciais antagonistas e produtos comerciais.	28
3.3. Testes de antagonismo <i>in vitro</i>	28
3.4. Inoculação artificial das sementes de soja com os fitopatógenos	29
3.5. Tratamento de sementes	30
3.6. Teste de sanidade	31
3.7. Teste de germinação	32
3.8. Teste de emergência	33
3.9. Análise estatística	33
4. EXPERIMENTO 1: ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. SCHOENANTHUS</i> (CAPIM-CAMELO) E TIMOREX GOLD® - RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
4.1. Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	35
4.2. Teste de sanidade	38
4.3. Teste de germinação	40

4.4. Teste de emergência	44
5. EXPERIMENTO 2: ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. SCHOENANTHUS</i> (CAPIM-CAMELO), BISFP E TRICHODERMIL SC.® – RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
5.1. Teste de antagonismo <i>in vitro</i>	47
5.2. Teste de sanidade.....	49
5.3. Teste de germinação	51
5.4. Teste de emergência	56
6. CONCLUSÃO.....	59
6.1. Experimento 1 - Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> (Capim-camelo), e Timorex Gold®	59
6.2. Experimento 2 - Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> (Capim-camelo), BISFP e Trichodermil sc.®.....	59
REFERÊNCIAS	61

RESUMO

Potencial do óleo essencial de capim-camelo (*Cymbopogon schoenanthus*), BISFP, Timorex Gold®, e Trichodermil sc.® no controle dos patógenos *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* em soja (*Glycine max*) via tratamento de sementes

A procura por alimentos mais saudáveis vem aumentando constantemente, junto desta crescente demanda existe a cobrança da sociedade por uma agricultura cada vez mais sustentável, com redução do uso de agroquímicos. As doenças fúngicas constituem um importante fator de redução de produtividade e qualidade dos produtos agrícolas. Os fitopatógenos fúngicos *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* mostram-se importantes, ocasionando grandes perdas e prejuízos anualmente. O tratamento convencional, com o uso de defensivos químicos, ainda é amplamente utilizado para a maioria dessas doenças. No entanto, além da crescente pressão da sociedade exigindo produtos vegetais livres de resíduos químicos, vemos também um aumento na seleção de fitopatógenos resistentes às moléculas sintéticas. Visto isso, o incentivo às pesquisas por métodos alternativos de controle tem aumentado. Cada vez mais estudos são conduzidos empregando o controle alternativo de doenças através do uso de agentes de controle biológico e bioinsumos, como os óleos essenciais de plantas, e pode-se observar a crescente demanda por produtos comerciais com base nesses métodos. Para tanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial efeito fungicida de agentes de controle alternativo, via testes de antagonismo *in vitro*, e a ação destes agentes via tratamento de sementes, através dos testes de sanidade, germinação e emergência. Os experimentos foram divididos em duas etapas, a primeira envolvendo o produto comercial Timorex Gold® e o óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus* (nome comum Capim-camelo) nas concentrações de 10% e 20% para o controle dos dois fitopatógenos. Os resultados com o produto Timorex Gold® foram satisfatórios, evidenciando uma significativa redução do crescimento micelial dos fitopatógenos no teste *in vitro*, controle parcial deles nos testes *in vivo*, e baixa fitotoxicidade das dosagens para as sementes. No entanto, o óleo essencial que ocasionou alta redução no crescimento micelial dos fungos no teste *in vitro* e redução da incidência do fitopatógeno no teste de sanidade *in vivo*, quando nos demais testes *in vivo*, exibiu um efeito fitotóxico, prejudicando a germinação e a emergência das sementes de soja. Por tanto, ele foi novamente testado em uma nova dosagem no experimento seguinte. O segundo experimento envolveu o óleo essencial de *C. schoenanthus*, o BISFP (um produto fornecido pela startup Ideelab Biotecnologia Ltda, o qual está em fase de desenvolvimento) e o produto comercial Trichodermil sc.®, sobre os mesmos fitopatógenos utilizados no experimento anterior (*C. truncatum* e *S. sclerotiorum*). O produto Trichodermil sc.® e o óleo essencial (em nova concentração) apresentaram controle satisfatório sobre os fitopatógenos nos testes *in vivo*. Por sua vez, o produto BISFP, além de apresentar um significativo controle sobre os patógenos nos testes *in vivo*, se destacou ao promover uma melhoria na qualidade fisiológica das sementes. Finalmente, fica evidente o potencial desses agentes abióticos e biótico no possível controle dos fitopatógenos utilizados *in vitro* e *in vivo* e/ou na ação destes agentes, via tratamento de sementes, com base na germinação e emergência das plântulas.

Palavras-chave: Controle alternativo, Controle biológico, Bioinsumos, Óleos essenciais, Fitopatógenos, Crescimento micelial, Fitotoxicidade, Tratamento de sementes

ABSTRACT

Potential of camel grass essential oil (*Cymbopogon schoenanthus*), BISFP, Timorex Gold[®], and Trichodermit sc.[®] in the control of pathogens *Colletotrichum truncatum* and *Sclerotinia sclerotiorum* in soybean (*Glycine max*) via seed treatment

Currently, the demand for healthier food is constantly increasing. Along with this growing demand there is a demand from the society for an increasingly sustainable agriculture, with a reduction in the use of agrochemicals. Fungal diseases are an important factor in reducing productivity and quality of agricultural products. Thus, phytopathogens such as the fungi *Colletotrichum truncatum* and *Sclerotinia sclerotiorum* exhibit are important, causing great losses annually. Conventional treatment, with the use of pesticides, is still widely used for most of these diseases. However, in addition to the increasing pressure from the society demanding by plant products free of chemical residues, we also see an increase in the selection of phytopathogens resistant to synthetic molecules. In view of this, the incentive to research for alternative methods of control has increased. More and more studies report on the alternative control of diseases using biological control agents and bio inputs, such as essential oils from plants, and the increase in commercial products based on these methods, can be observed. Therefore, the present work aimed to evaluate the potential fungicidal effect of alternative control agents, via *in vitro* antagonism test, and the action of these agents via seed treatment, through sanity, germination and emergence tests. The experiments were divided into two stages, the first involved the commercial product Timorex Gold[®] and the essential oil of *Cymbopogon schoenanthus* (common name Camel grass) under concentrations of 10% and 20% for the control of the two phytopathogens. The results with the product Timorex Gold[®] were satisfactory, presenting a significant reduction of the mycelial growth of the phytopathogens in the *in vitro* test, partial control over them in the *in vivo* tests, and low phytotoxicity of the dosages for the seeds. However, the essential oil that showed a high reduction in the mycelial growth of the fungi in the *in vitro* test, and reduction of the incidence of the phytopathogen in the *in vivo* sanity test, in the *in vivo* test exhibited a phytotoxic effect, impairing the germination and emergence of soybean seeds. Thus, because of that it was tested again on a new dosage in the following experiment. The second experiment involved the essential oil of *C. schoenanthus*, BISFP (a product furnished by the startup Ideelab Biotechnology Ltda, which is under development) and the commercial product Trichodermit sc.[®], on the same phytopathogens as the previous experiment (*C. truncatum* and *S. sclerotiorum*). The product Trichodermit sc.[®] and the essential oil (in new concentration) showed satisfactory control over the phytopathogens in *in vivo* tests. The BISFP product, in addition to presenting a significant control over the pathogens in the *in vivo* tests, stood out by promoting an improvement in the physiological quality of the seeds. Finally, it is evident the potential of these abiotic and biotic agents in the possible control of the phytopathogens used *in vitro* and *in vivo* and/or in the action of these agents, via seed treatment, based on the germination and emergence of the seedlings.

Keywords: Alternative control, Biological control, Bioinputs, Essential oils, Phytopathogens, Mycelial growth, Phytotoxicity, Seed treatment

1. INTRODUÇÃO

A cultura da soja (*Glycine max* (L.) Merr.) é amplamente cultivada em todo o mundo, sendo uma *commoditie* indispensável para movimentar o agronegócio. Para a safra 2021/22 foi estimado pela Conab (2022) uma produção de 125,47 milhões de toneladas de soja pelo Brasil, apontando uma queda de 9% em comparação a safra anterior, devido as condições climáticas. A quantia destinada às exportações também foi reduzida, sendo estimada para esta safra, 80 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Já o relatório realizado e emitido pela USDA no fim de 2021, projetou para a safra de 2021/22 um rendimento de 381,78 milhões de toneladas de soja no mundo, sendo o Brasil responsável pela produção de 144 milhões de toneladas (37%) (USDA, 2021). Tanto na estimativa feita pela Conab quanto na realizada pela USDA, o Brasil segue em destaque como o maior produtor da *commoditie* no mundo.

Esta cultura, no entanto, poderia apresentar rendimentos maiores, se não fosse afetada por diversos problemas fitossanitários, como doenças causadas por fungos, bactérias, vírus e nematoides. Os patógenos *Colletotrichum truncatum*, agente causal da Antracnose e *Sclerotinia sclerotiorum*, agente causal do Mofo Branco, estão entre as doenças fúngicas mais importantes que acometem a cultura. Quando se trata a respeito da Antracnose, os maiores danos ocorrem em regiões com altas temperaturas e prolongados períodos de chuva (MANANDHAR; HARTMAN, 1999). Já o Mofo Branco tem como condições ideais para seu desenvolvimento, temperaturas amenas e alta umidade relativa do ar (EMBRAPA, 2014). A entrada, de ambos os patógenos, no campo deve ser evitada ao máximo, uma vez que, após introduzidos, apresentam controle e erradicação difíceis.

O fungo *Colletotrichum truncatum* é considerado um fitopatógeno de ampla distribuição geográfica e de inúmeros hospedeiros (CAI L ET AL., 2009). A infecção em plantas de soja por este fungo pode ocorrer durante todo o ciclo da cultura. Quando constatado infectando as sementes pode impedir a germinação ou causar a morte de plântulas, podendo nestas haver manchas necróticas deprimidas e de coloração escura nos cotilédones, necrose nos pecíolos, manchas-marrons irregulares nas folhas, hastes e vagens além da desfolha prematura (GODOY ET AL., 2016).

De acordo com Manandhar e Hartman (1999) as vagens que foram infectadas no início poderão produzir sementes de qualidade reduzida. As principais fontes de inóculo de *C. truncatum* são sementes infectadas, restos culturais e hospedeiros alternativos (GODOY ET AL., 2016; SCHNEIDER ET AL. 1974). O manejo da Antracnose se baseia, essencialmente, no uso de

sementes sadias, aplicação de fungicidas, rotação de cultura, eliminação de hospedeiros alternativos e redução da densidade de plantio (GODOY ET AL., 2016, HARTMAN, 1999).

Também de caráter importante, a doença Mofo-branco, causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, é uma das doenças de soja mais conhecidas devido sua grande participação nas perdas em produtividade, e por ocorrer em diversas outras culturas (MEYER ET AL., 2019). Novamente as sementes estão presentes como a principal fonte de inóculo primário do fungo, ocorrendo tanto pela infecção micelial delas quanto pelo carregamento de escleródios misturados a elas (GOULART, 2018); para tanto, o cuidado com o beneficiamento e com a sanidade das sementes deve ser alto.

A presença de micélio branco típico e a formação de escleródios negros nas sementes, são sintomas típicos da infecção e presença deste fitopatógeno, que pode ocasionar a morte de plântulas na pós-emergência (GOULART, 2018). O manejo do Mofo-branco envolve a adoção conjunta de medidas culturais, uso de fungicidas e agentes de controle biológico, a fim de reduzir a quantidade de inóculo (MEYER ET AL., 2019).

Para ambos os fungos é recomendado o uso de fungicidas, contudo, o uso não judicioso de pesticidas químicos visando aumentar a produção agrícola pode ocasionar a contaminação do solo, além de estar sendo associado a problemas de saúde humana e ambiental em todo o mundo (QUEIROZ ET AL., 2018). Vale frisar que o uso contínuo e indiscriminado pode promover a seleção de fungos fitopatogênicos resistentes, não controlados pelo fungicida que já foi anteriormente eficaz, colocando em risco a eficiência do método.

Atualmente, devido a uma grande pressão social e ambiental, com foco na preservação do meio ambiente e da pressão de seleção de patógenos e pragas, o controle alternativo vem ganhando espaço e visibilidade no mercado, aumentando com isso a utilização de bioinsumos. Esta situação está levando os pesquisadores a explorar abordagens novas e não convencionais (CAMÓ ET AL., 2019). Neste sentido, alguns microrganismos se destacam por apresentarem capacidade antagônica sobre outros, podendo os mecanismos desta atividade ser a antibiose, competição, parasitismo, hipovirulência, predação ou indução de resistência (MEDEIROS ET AL., 2018); além de extratos vegetais que também estão apresentando grandes contribuições nas medidas de controle alternativo.

Um fungo amplamente utilizado em produtos de controle biológico é o *Trichoderma* spp. Podemos observar inúmeros estudos a respeito deste gênero de microrganismo, a maioria com resultados positivos sobre a inibição de fitopatógenos. Kumar et al., (2012) descrevem os mecanismos do fungo como micoparasitismo, enzimas degradadoras de parede de outros fungos, produção de antibióticos e parasitismo de fungos fitopatogênicos. Os bioinsumos derivados de

plantas (óleos essenciais e extratos), têm potencial em agir de maneira fungitóxica sobre fitopatógenos. Os óleos essenciais de *Cymbopogon* spp. e *Melaleuca alternifolia*, são exemplos de extratos vegetais com eficácia comprovada na inibição do crescimento de alguns fitopatógenos como *Sclerotinia sclerotiorum* e *Colletotrichum gloeosporioides* (BERNARDI ET AL., 2019; STEFFEN ET AL., 2019; CARNELOSSI ET AL., 2009).

Ainda sob o leque dos bioinsumos, podemos observar a utilização de extrato de leveduras, extrato de algas, aminoácidos, vitaminas e ácidos orgânicos como bioestimulantes para plantas. Tais elementos já foram relatados por proporcionar alterações fisiológicas, bioquímicas, expressão de genes (DERNER, 2020), promover o desenvolvimento radicular e a resistência a estresses bióticos e abióticos (CARVALHO, 2014), e o controle de doenças por diferentes mecanismos antagônicos (MACHADO & BETTIOL, 2010). Além de produzirem importantes bioativos como fito hormônios, enzimas e aminoácidos (MUKHERJEE & SEN, 2015).

Visto a ascensão do mercado dos biológicos, este trabalho tem como objetivo: avaliar a eficiência dos potenciais e comerciais bioinsumos (óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus*, BISPF, Timorex Gold[®] e Trichodermil sc.[®]) como tratamento de sementes de soja para a erradicação de dois fitopatógenos (*Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum*), que acometem a cultura da soja, através de testes *in vitro* de antagonismo, e testes *in vivo* de sanidade, germinação e emergência de sementes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Cultura da soja

A soja, pertencente à família Fabaceae, se tornou uma das principais *commodities* nacionais (LAZZAROTTO & HIRAKURI, 2010). Por volta de 1970, essa leguminosa aparecia como a principal cultura agrícola devido aos amplos incentivos do governo, acarretando a criação da Embrapa Soja em 1975. A consolidação desta cultura por toda a extensão do país se deu graças ao forte programa de melhoramento, visando a adaptação aos diferentes climas nacionais (APROSOJA, 2019). A estabilidade da cultura, no entanto, pode ainda ser afetada pelos diversos problemas incidentes sobre ela, como a ocorrência de doenças, que limitam consideravelmente sua produtividade (EMBRAPA, 2018).

As sementes, que são a forma de propagação da cultura, exigem grande atenção, uma vez que muitos microrganismos podem estar associados a elas. Sementes portadoras de agentes causais de doenças são capazes de introduzir e disseminar patógenos no campo, podendo causar prejuízos diretos elevados (GOULART, 2018). No Brasil, sementes infectadas já causaram e causam de 10% a 20% de perdas, correspondendo a uma redução de 8 a 16 milhões de toneladas de grãos por ano (GOULART, 2018).

O manejo adequado de doenças é um fator de extrema importância para garantir o bom desempenho da cultura. A adoção conjunta de medidas culturais, uso de fungicidas e controle alternativo pode ajudar a reduzir a presença de alguns fitopatógenos importantes como *C. truncatum* e *S. sclerotiorum* (MEYER ET AL., 2019).

Dados retirados da Conab (2021) projetavam uma produção de 140,5 milhões de toneladas para a safra 2021/22 no Brasil, no entanto, devido as condições climáticas, esta estimativa caiu para 125,47 milhões de toneladas (CONAB, 2022). Mesmo com esta redução, o Brasil segue como o maior produtor do *commodity* do mundo. De acordo com Hirakuri e Lazzarotto (2014), o Brasil possui grande potencial de expansão da área cultivada, isso devido à disponibilidade de área, condições tecnológicas, meteorológicas e topográficas favoráveis presentes no país. Porém, vale ressaltar, a necessidade do manejo adequado da cultura para que as estimativas sejam alcançadas.

2.2. Sementes

Noventa por cento das culturas utilizadas para a alimentação tem como material propagativo as sementes (BRASIL, 2009A). De acordo com o Manual de Análise Sanitária de

Sementes (BRASIL, 2009B), anexo às Regras de Análise de Sementes do MAPA, as sementes “podem abrigar e transportar microrganismos ou agentes patogênicos de todos os grupos taxonômicos, causadores e não causadores de doenças”. Portanto, tanto a qualidade fisiológica das sementes quanto a qualidade sanitária são de extrema importância para o sucesso da implantação de uma cultura.

No Brasil, a patologia de sementes tem grande visibilidade e importância, isso porque em 1977 foi criado na Abrates o “Comitê de Patologia de Sementes (COPASEM)”. No decorrer do tempo, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) originou o “Grupo Técnico Permanente em Sanidade de Sementes (GTPSS)”, e houve a edição de uma gama de livros a respeito do assunto, proporcionando ao país uma posição de destaque (BRASIL, 2009A).

Atualmente, podemos encontrar protocolos simplificados para a análise sanitária de sementes, como por exemplo, no “Manual de Análise Sanitária de Sementes” do MAPA. De acordo com este manual (BRASIL, 2009A), a princípio, deve-se sempre realizar a associação da interação entre sementes e patógeno; sendo que dentre os patógenos associados às sementes, os fungos englobam o maior número de espécies patogênicas.

O transporte fúngico pelas sementes pode ocorrer de três maneiras: através do transporte passivo por partículas contraminadas de sujeira que são transportadas juntas às sementes; através da adesão passiva do fungo à superfície da semente; e por fim, através da presença fúngica nos tecidos das sementes (BRASIL, 2009B). De acordo com o “Manual de Análise Sanitária de sementes” (BRASIL, 2009B), agrupar os patógenos conforme sua morfologia é importante para a identificação sanitária; bem como separá-los pela natureza de parasitismo, uma vez que os biotróficos não completam seu ciclo biológico em condições artificiais, impedindo a formação de estruturas típicas e com isso dificultando a detecção e classificação do patógeno.

2.3. *Colletotrichum truncatum*

O fungo *Colletotrichum truncatum* é considerado um fitopatógeno de ampla distribuição geográfica e de inúmeros hospedeiros (CAI L ET AL., 2009). De acordo com Goulart (2009) a incidência desse patógeno em sementes de soja produzidos no Brasil é baixa, sendo de 0,5% no Rio Grande do Sul e 6,5% no Mato Grosso do Sul. Porém com a expansão da cultura, observou-se um aumento considerável da presença deste fungo nas sementes.

Este fitopatógeno tem capacidade para atacar todas as partes da planta de soja durante a fase vegetativa, floração e frutificação, e a infecção por este fungo pode ocorrer durante todo o

ciclo da cultura (GOULART, 2009). A semente de soja é o mais eficiente veículo de transmissão e disseminação dele, que ocasiona na doença chamada Antracnose.

Quando este fungo é constatado infectando as sementes, ele pode impedir a germinação ou causar a morte de plântulas, podendo haver manchas necróticas deprimidas e de coloração escura nos cotilédones, necrose nos pecíolos, manchas-marrons irregulares nas folhas, hastes e vagens além da desfolha prematura (Figura 1 A, B e C e Figura 2) (GODOY ET AL., 2016). De acordo com Manandhar e Hartman (1999), as vagens que foram infectadas no início da formação poderão produzir sementes de qualidade reduzida.



Figura 1: Antracnose em sementes de soja (A); Necrose nos cotilédones por antracnose (B); Antracnose nas hastes de plantas de soja (C). Fonte: Goulart, 2009.



Figura 2: Antracnose nas vagens de soja. Fonte: Rizobacter, 2021.

Para a identificação deste fitopatógeno nas sementes, é necessário fazer uma incubação das sementes para então observar a presença de acérvulos típicos da espécie (Figura 3). Estes acérvulos são corpos de frutificação, com presença de setas escuras e matriz mucilaginosa onde os conídios se encontram (Figura 3) (GOULART, 2009).



Figura 3: Acérvulos de *Colletotrichum truncatum* com a presença de setas escuras e matriz mucilaginosa. Fonte: Goulart, 2009.

As condições ideais para o desenvolvimento deste fungo são altas temperaturas e prolongados períodos de chuva. No cerrado, a Antracnose tem sido considerada uma das

principais doenças, uma vez que suas condições condizem com as ideais e são favorecidas pela monocultura, semeadura direta e plantio adensado, ocasionando em perdas de até 90 Kg/ha de grãos de soja (DIAS; INHEIRO; CAFÉ-FILHO, 2016).

É sabido que a principal fonte de inóculo de *C. truncatum* é a semente infectada. Uma vez que o patógeno é introduzido no campo, ele pode sobreviver na entressafra em restos culturais, sendo estes uma outra fonte de inóculo. Além das sementes e dos restos culturais, os hospedeiros alternativos também são potenciais fontes, ao hospedar o fitopatógeno na ausência da soja.

Visto essas possibilidades, o uso de sementes saudáveis, rotação de cultura, aplicação de fungicidas, eliminação de hospedeiros alternativos e redução da densidade do plantio, se tornam essenciais para o manejo da doença (GODOY ET AL., 2016; SCHNEIDER ET AL., 1974); além da utilização de cultivares menos suscetíveis e tratamento de sementes (AGRO BAYER, 2021).

2.4. *Sclerotinia sclerotiorum*

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é amplamente conhecido como o agente causal do Mofobranco, ou da Podridão branca da haste e da vagem. As sementes são consideradas a principal fonte de inóculo primário da doença, tanto via micelial quanto via escleródios (Figura 4) (GOULART, 2018).



Figura 4: A, B e C - Escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* misturados com as sementes de soja. Fonte: Goulart, 2018.

O cuidado com o beneficiamento e com a sanidade das sementes deve ser alto, uma vez que uma semente infectada tem potencial de produzir mais que um escleródio. Através da germinação carpogênica, cada escleródio tem o potencial de produzir cerca de 20 apotécios (Figura 5) com a capacidade individual de liberar cerca de 2 milhões de ascósporos (Figura 6), em aproximadamente 10 dias (GOULART, 2018). Estes ascósporos são caracterizados como hialinos, unicelulares, ovais e levemente alongados (GOULART, 2018).



Figura 5: A e B - Formação de apotécios nos escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum*. Fonte: Goulart, 2018.

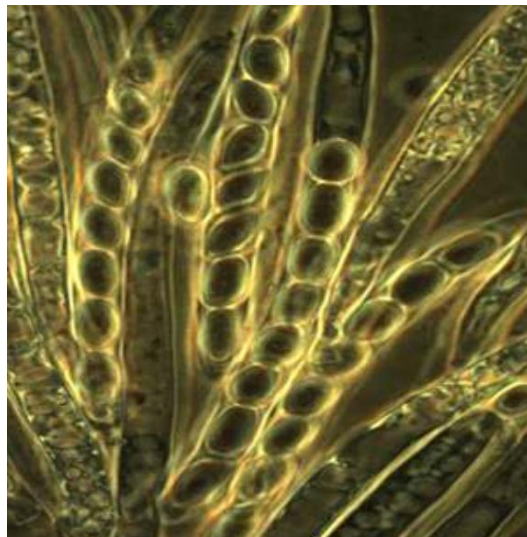


Figura 6: Ascospores em seu interior. Fonte: Goulart, 2018.

Os sintomas típicos deste fitopatógeno sobre sementes infectadas, são caracterizados pela presença de micélio branco e formação de escleródios negros (Figura 7). No caso de testes de sanidade pelo método do Neon, observa-se a formação de halos amarelados no meio de cultura, ao redor das sementes infectadas (Figura 8) (GOULART, 2018). Quando presente naturalmente ou inoculado artificialmente nas sementes, este fitopatógeno pode ocasionar a morte de plântulas pós-emergência (GOULART, 2018).

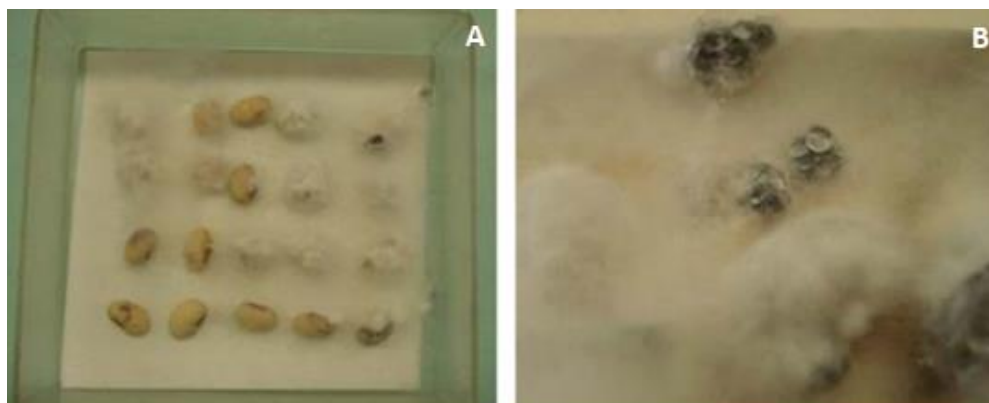


Figura 7: Presença de micélio e escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* crescendo em sementes de soja incubadas em *blotter test*. Fonte: Goulart, 2018.



Figura 8: Detecção da presença de *Sclerotinia sclerotiorum* pela formação de halos amarelados ao redor das sementes de soja, através do método Neon. Fonte: Goulart, 2018.

Dentre os 36,8 milhões de hectares cultivados com soja na safra 2019/2020 no Brasil (CONAB, 2020), estima-se que 10 milhões estavam infestadas pelo fitopatógeno (MEYER ET AL., 2019), totalizando 27% do total da área, dimensionando sua importância. Esta doença é manejada através da adoção conjunta de medidas culturais, uso de fungicidas e agentes de controle biológico, tendo este último como principal ação sobre tal fitopatógeno, o parasitismo e a degradação de escleródios no solo (MEYER ET AL., 2019).

2.5. Controle alternativo

Várias práticas de manejo podem auxiliar na redução de inóculo, atuando na inviabilização dos escleródios no solo e na diminuição da produção de escleródios nas plantas, como: cobertura do solo com palhada, rotação e/ou sucessão com culturas não hospedeiras, uso de controle biológico, tratamento de sementes com produtos biocidas e pulverizações foliares

com químicos ou biológicos nos estádios reprodutivos que são os mais vulneráveis (MEYER ET AL., 2019; PELTIER ET AL., 2012).

O controle alternativo consiste numa estratégia de controle que não envolve moléculas sintéticas. Neste cenário, o uso de bioinsumos para controle de pragas e doenças, pode ser considerado como um controle alternativo, uma vez que tem origem vegetal, animal ou microbiana (PASCHOLATI, 1998; MAPA, 2020).

2.5.1 Bioinsumos

De acordo com o MAPA (2020) a definição de bioinsumos consiste em “o produto, o processo ou a tecnologia de origem vegetal, animal ou microbiana, destinado ao uso na produção, no armazenamento e no beneficiamento de produtos agropecuários, nos sistemas de produção aquáticos ou de florestas plantadas, que interfiram positivamente no crescimento, no desenvolvimento e no mecanismo de resposta de animais, de plantas, de microrganismos e de substâncias derivadas e que interajam com os produtos e os processos físico-químicos e biológicos”.

Como descrito por Matos (1997), compostos secundários de plantas, como por exemplo o óleo essencial, estão se tornando cada vez mais interessantes como medida alternativa no controle de fitopatógenos, uma vez que apresentam substâncias com propriedades fungitóxicas. Estes compostos, podem, além de reduzir os riscos prejudiciais ao meio ambiente e à saúde do homem, serem mais eficazes do que certos produtos sintéticos (STANGARLIN ET AL., 1999).

Alcaloides, terpenos, flavonoides, quinonas, esteroides entre outras, são classes às quais os compostos de plantas pertencem (DI STASI, 1996), diversidade esta, que motiva o desenvolvimento de pesquisas sobre os efeitos fungitóxicos dos extratos vegetais (FRANZENER ET AL., 2003). Lyon et al. (1995) e Schwan-Estrada et al. (2000) relatam a respeito do potencial controle de óleos essenciais através, tanto da ação fungitóxica direta, quanto da indução de resistência.

Além do extrato de planta, agente biológico de controle também se enquadra na definição de bioinsumos. Ainda de acordo com o MAPA (2020) este agente é o “organismo, assim considerado microrganismo e inimigo natural, de ocorrência natural, introduzido no ambiente para o controle de uma população ou de atividade biológica de outro organismo vivo considerado nocivo”. Um destaque, dentre os fungos utilizados para o controle de doenças é o *Trichoderma* spp.

Outros bioinsumos também estão em ascensão, podemos observar a utilização de extrato de leveduras, extrato de algas, aminoácidos, vitaminas e ácidos orgânicos como bioestimulantes para plantas. Em seu estudo Derner (2020) relatou, a respeito de tais elementos, alterações fisiológicas, bioquímicas e expressão de genes.

A promoção do desenvolvimento radicular e a resistência a estresses bióticos e abióticos por estes elementos foi observada por Carvalho (2014), enquanto Machado e Bettiol (2010) relataram o controle de doenças por diferentes mecanismos antagônicos. Além destes efeitos citados acima, também foi constatado a capacidade de produzirem importantes bioativos como fito hormônios, enzimas e aminoácidos (MUKHERJEE & SEN, 2015).

2.6. Óleo essencial de capim-camelo (*Cymbopogon schoenanthus*)

Atualmente o uso de óleos essenciais no controle de doenças vem ganhando visibilidade e espaço. Alguns estudos comprovam a ação do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (Capim-limão), pertencente ao mesmo gênero que o *Cymbopogon schoenanthus* (Capim-camelo), sobre determinados fitopatógenos, como por exemplo a inibição no crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* (BERNARDI ET AL., 2019). Carvalho et al. (2008), Souza Júnior et al. (2009), Carnelessi et al. (2009) e Silva et al. (2009) relataram o efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão sobre o fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*, o qual teve redução ou até mesmo inibição em seu desenvolvimento (crescimento micelial e esporulação). Observou-se também a redução do crescimento micelial de *Cladosporium fulvum* por Itako et. al. (2009) e de *Cercospora coffeicola* por Pereira et.al. (2011).

O capim-camelo (*Cymbopogon schoenanthus*) é uma grama compacta, perene com formação de densas touceiras, que cresce selvagem na maioria dos países da África e Ásia (OZENDA, 1991). Tanto a parte aérea da planta quanto suas raízes, produzem óleo essencial (KATIKI ET AL., 2011), que é composto majoritariamente por piperitona e δ -2-careno (BOSSOU ET AL., 2013). Na área agrônômica ainda existem poucos estudos a respeito desta espécie, embora existam resultados que apontam os efeitos deste óleo sobre pragas, como relatado por Bossou et al. (2015) indicando um promissor efeito contra *Tribolium castaneum* (Besouro Castanho).

2.7. BISFP

O produto que está em desenvolvimento pela startup Ideelab Biotecnologia Ltda, denominado BISFP, é composto por ácidos orgânicos, extrato de levedura, extrato de algas,

aminoácidos e vitaminas. É um produto que atua sobre a indução de resistência, promoção de crescimento e efeito *Priming*. No entanto, no presente trabalho está sendo testado como um potencial bioinsumo no tratamento de sementes de soja contra fitopatógenos, além de promover a germinação das sementes e crescimento vegetal.

Derner (2020) descreve que os extratos de algas atuam como bioestimulantes nas plantas por meio de alterações fisiológicas, bioquímicas e de expressão de genes. Muitos produtos são comercializados contendo essas algas, sendo que a aplicação pode ser realizada via foliar, irrigação, no solo ou como tratamento de sementes, sendo este último método o de melhor aproveitamento para promover o desenvolvimento radicular e resistência aos estresses bióticos e abióticos (CARVALHO, 2014).

As leveduras (fungos unicelulares) foram relatadas como importantes aliadas no controle de doenças, uma vez que exibem diferentes mecanismos antagônicos, dentre eles a antibiose e o parasitismo, além da promoção de crescimento (MACHADO & BETTIOL, 2010). Em um experimento realizado por Calixto (2020), foi observada o aumento na produtividade de grãos de soja de 44,4% e de 41,5% devido à redução da incidência de antracnose, tais números foram obtidos, respectivamente, em função do tratamento com as leveduras *Rhodotorula glutinis* e *Saccharomyces cerevisiae*. Mukherjee e Sen (2015), comentam também, sobre importantes bioativos como, fitormônios, aminoácidos e enzimas, que podem ser produzidos por certas leveduras.

2.8. Timorex Gold®

O Timorex Gold® é um produto registrado da empresa Stockton, sendo composto pelo óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* na concentração de 222,5 g/L. Como descrito por Arici et al. (2019), este produto já provou eficácia no controle de doenças como a murcha de *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f. sp. *Dianthi*) em cravo, através da aplicação prévia ao confronto planta-patógeno. Luiz (2017) comprovou a indução de resistência, pelo aumento no acúmulo de compostos fenólicos em folhas de morangueiro contra a bactéria fitopatogênica *Xanthomonas fragariae*. Um estudo realizado por Steffen et al. (2019) concluiu que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresenta ação antifúngica sobre o crescimento *in vitro* de *S. sclerotiorum* e *Fusarium* spp., apresentando resultados positivos significativos até na menor concentração (0,1%), e inibição total do crescimento de ambos os fitopatógenos quando na concentração de 0,5%.

Os componentes majoritários deste óleo essencial são terpenos e seus álcoois, considerados como eficazes anti-sépticos, bactericidas e fungicidas (CARSON ET AL., 2006; COX ET AL., 2001; SHAO ET AL., 2013; REUVENI ET AL., 2020). Como relatado por Cox et al. (2000,

2001) e Carson et al. (2002), as atividades fungicidas e antimicrobianas do óleo essencial de *M. alternifolia* surgem de sua capacidade em alterar a permeabilidade das estruturas da membrana; seus componentes destroem a integridade celular, inibem processos de respiração, o transporte de íons e aumentam a permeabilidade da membrana em células de levedura e mitocôndrias isoladas. O primeiro relato sobre a indução de resistência em bananeiras através do óleo essencial de *M. alternifolia* foi realizado por Dalio et al. (2020), indicando o aumento na expressão de genes marcadores para SAR (resistência adquirida sistêmica) e ISR (resistência sistêmica induzida).

2.9. Trichodermil sc.[®] (*Trichoderma harzianum* CEPA ESALQ 1306)

O Trichodermil sc.[®] comercializado pela empresa Holandesa Koppert Biological Systems é composto por uma suspensão concentrada de conídios do fungo *Trichoderma harzianum* (CEPA ESALQ 1306). É classificado como fungicida e nematicida biológico, com recomendação para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja, através da aplicação foliar numa dose de 0,5 a 1,0 L/ha.

A germinação dos escleródios de *S. sclerotiorum* pode ser miceliogênica ou carpogênica (formação de apotécios) (REIS ET AL., 2019) e o controle biológico por sua vez, ocorre principalmente pela ação de microrganismos que parasitam e degradam os escleródios ou desempenham efeito inibidor da germinação carpogênica, reduzindo a densidade de inóculo (GHAZANFAR ET AL., 2018). Atualmente 33 fungicidas microbiológicos estão registrados para o controle de *S. sclerotiorum*, sendo 60% a base de *T. harzianum* e *T. asperellum*, 18% a base de *B. amyloliquefaciens* e *B. subtilis* e 21% em misturas destes (AGROFIT, 2020).

Em um experimento realizado por Rezende (2011), foi possível constatar o mecanismo de ação de hiperparasitismo do *Trichoderma* spp. através de microscopia eletrônica de varredura, onde foi mostrado o estrangulamento e penetração das hifas do antagonista sobre o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. Além de evidenciar o mecanismo de ação, Rezende (2011) também realizou o tratamento de sementes com o produto Trichodermil sc., com o qual obteve 40% de redução da incidência de mofo-branco em comparação a testemunha sadia.

As espécies de *Trichoderma* spp. estão recebendo cada vez mais atenção da pesquisa por sua versatilidade de ação, capacidade na produção de substâncias antifúngicas e enzimas degradadoras de parede celular de outros fungos, e da sua diversidade estratégica de sobrevivência. Tudo isso garante a este gênero uma alta competitividade no ambiente, e uma grande capacidade de proliferação na rizosfera (LOUZADA ET AL., 2009; ASAD ET AL., 2015).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local

Os testes *in vitro* foram realizados no laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, no Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ/USP. Os testes *in vivo* foram realizados em casa de vegetação e laboratório, pertencente ao Laboratório de Patologia de Sementes da ESALQ/USP.

3.2. Obtenção

3.2.1. Material vegetal

As sementes de soja utilizadas foram da variedade M6410IPRO fornecidas pelo Laboratório de Patologia de Sementes da Esalq/USP. Foi realizada a caracterização fisiológica e sanitária das sementes antes de cada experimento.

Para o experimento 1, foi constatada a presença de 13% de *Aspergillus* sp., 3% de *Penicillium* sp., 11% de *Rhizopus* sp., e 0,5% de *Phoma* sp. além da ausência dos fungos *C. truncatum* e *S. sclerotiorum*. O vigor das sementes estava alto e a germinação foi de 92%.

Para o experimento 2, foi constatada a presença de 15% de *Aspergillus* sp., 2% de *Penicillium* sp., e 15% de *Rhizopus* sp. além da ausência dos fungos *C. truncatum* e *S. sclerotiorum*. O vigor das sementes estava alto e a germinação foi de 89%.

3.2.2. Isolados fitopatogênicos

Os isolados de *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum* foram obtidos, respectivamente, junto ao Laboratório de Micologia e Laboratório de Patologia de Sementes, sendo mantidos pelo laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, pertencentes à ESALQ/USP. Os fitopatógenos foram cultivados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) em placas de Petri em câmaras de crescimento tipo B.O.D (Biochemical Oxygen Demand) em condições de 25 °C e fotoperíodo de 12 horas.

3.2.3. Potenciais antagonistas e produtos comerciais.

O óleo essencial de Capim-camelo é puro e foi fornecido pela WNF e o produto BISFP foi fornecido pela Ideelab Biotecnologia Ltda. Os produtos comerciais Timorex Gold®, da empresa Stockton, e o Trichodermil sc.®, da empresa Koppert, foram fornecidos pelas respectivas empresas. Todos os quatro produtos foram armazenados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ/USP.

No experimento 1 foram utilizados os bioinsumos: Óleo essencial de *C. schoenanthus* (Capim-camelo) e Timorex Gold. Cada produto esteve nas concentrações de 10% e 20% em uma calda de 5 mL para cada 100g de sementes.

No experimento 2 foram utilizados os bioinsumos: Óleo essencial de *C. schoenanthus* (Capim-camelo), BISFP e Trichodermil sp. Cada produto foi testado na concentração de 40% em uma calda de 0,5 mL para cada 100g de sementes.

3.3. Testes de antagonismo *in vitro*

Os testes de antagonismo foram realizados em placas de Petri (90 x 25 mm) contendo meio BDA (batata, dextrose e ágar). Nas placas destinadas ao controle negativo, o produto (óleo essencial de Capim-camelo ou Timorex Gold ou BISFP) foi depositado nas doses de 0,5 µL, 15 µL; 25 µL e 50 µL e espalhado pela superfície com o auxílio de uma alça de Drigalski. O controle positivo continha apenas os microrganismos fitopatogênicos repicados (em discos de 14 mm) ao centro da placa. Nas placas destinadas ao teste de antagonismo, cada um dos produtos foi pipetado e espalhado nas placas com suas diferentes dosagens, com o auxílio de uma alça de Drigalski; em seguida um disco contendo colônia fúngica de um dos fitopatógenos foi disposto ao centro (HILLEN ET AL., 2012). Os tratamentos estão descritos na tabela 1.

Tabela 1. Tratamentos *in vitro* para observação do efeito dos agentes abióticos sobre *Colletotrichum truncatum* e *Sclerotinia sclerotiorum*

Tratamento	Inóculo fitopatogênico
-	<i>Colletotrichum truncatum</i>
-	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 5 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 10 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 5 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 10 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Timorex Gold® 15 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
Timorex Gold® 25 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
Timorex Gold® 50 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
Timorex Gold® 15 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Timorex Gold® 25 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Timorex Gold® 50 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
BISFP 5 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
BISFP 10 µL	<i>Colletotrichum truncatum</i>
BISFP 5 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
BISFP 10 µL	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>

As placas foram acondicionadas em BOD com fotoperíodo de 12h, e permaneceram durante sete dias em temperatura de 25 °C. As medições foram realizadas com base no diâmetro de crescimento (média de duas medidas diametralmente opostas) dos fitopatógenos, iniciadas 24 horas após a instalação do experimento e efetuadas diariamente até o dia em que as colônias do tratamento controle positivo cobriram totalmente a superfície do meio. De acordo com o crescimento dos fitopatógenos, foi realizado o cálculo da porcentagem de inibição de crescimento (PIC) através da fórmula: $PIC = [(diâmetro da testemunha - diâmetro do tratamento) / diâmetro da testemunha] \times 100$. Para cada tratamento em relação à testemunha (HILLEN ET AL., 2012).

3.4. Inoculação artificial das sementes de soja com os fitopatógenos

De acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009A), para a cultura da soja, as sementes devem estar, naturalmente ou artificialmente, contaminadas a níveis superiores a 10% do fitopatógeno objeto de estudo. Visto isso, as sementes foram previamente submetidas a um teste de sanidade com a finalidade de verificar a incidência natural de ambos fitopatógenos. Como esta incidência natural foi inferior a 10%, foi necessária a inoculação artificial das sementes com cada um dos fungos.

Os isolados de *C. truncatum* e *S. sclerotiorum* foram utilizados para inocular artificialmente sementes de soja, previamente submetidas a assepsia com hipoclorito de sódio a 1% por 3 minutos e secas por 24 horas à temperatura ambiente em superfície asséptica.

Para a inoculação das sementes com os agentes fitopatogênicos, foi utilizada a técnica do contato direto com as colônias fúngicas (KOCH ET AL., 2017). Em placas contendo meio de cultivo BDA (batata, dextrose e ágar) e restritor hídrico Manitol a -1,0 Mpa (COSTA ET AL., 2004) com colônias de *C. truncatum* ou *S. sclerotiorum* colonizando toda sua superfície, foram depositadas sementes sobre toda a superfície fúngica, onde permaneceram 24h sobre a colônia. Passado este período de contato, as sementes foram retiradas das placas e mantidas durante 24h em ambiente ventilado e asséptico, para secagem.

Foi realizada uma mistura das sementes, em proporção de uma parte de sementes inoculadas para uma parte de sementes sadias. As sementes sadias passaram pelo mesmo processo de assepsia e contato com BDA + Manitol -1 Mpa, porém, sem nenhum fitopatógeno colonizando a placa.

3.5. Tratamento de sementes

As sementes inoculadas ou não-inoculadas com os fitopatógenos, foram posteriormente tratadas com um dos bioinsumos como descrito na tabela 2. O tratamento foi realizado em sacos plásticos, sendo as amostras agitadas manualmente até a completa homogeneização. Todos os produtos foram preparados previamente nas doses recomendadas de cada experimento e a partir deste retirou-se uma alíquota para tratar as sementes.

Referente ao experimento 1, o tratamento foliar com Timorex Gold® é recomendado na concentração de 1,0-2,0 L/ha, considerando volume de calda de 300 L/ha. Porém no presente trabalho, este produto foi testado para o tratamento de sementes, e como não há registros a respeito, duas concentrações foram selecionadas e usadas, sendo estas de 10% e 20% em uma calda de 5 mL para cada 100 g de sementes. O tratamento das sementes com o óleo essencial de capim-camelô foi realizado nas mesmas concentrações de 10% e 20% em uma calda de 5 mL para cada 100 g de sementes.

No experimento 2, o volume da calda utilizada de óleo essencial de *C. schoenanthus* (Capim-camelô), BISFP e Trichodermil sc., foi de 0,5% do peso das sementes, sendo 0,3% de água e 0,2% de produto. De acordo com as recomendações, a aplicação foliar com o produto Trichodermil sc. deve ser nas dosagens de 0,5 a 1,0 L/ha quando o objetivo for a eliminação do Mofo-branco. No entanto, foi utilizada a recomendação para tratamento de sementes de outros

produtos comerciais destinados à tal, como por exemplo o Ecotrich ES® da empresa Ballagro, que também possui o *Trichoderma harzianum* como princípio ativo.

Ambos os experimentos (1 e 2) contaram com uma testemunha sadia, sementes sadias tratadas com água destilada, e com uma testemunha inoculada, sementes previamente inoculadas e tratadas com água destilada.

Tabela 2. Tratamentos realizados nas sementes para os testes de sanidade, germinação e emergência em resposta aos agentes abióticos ou biótico na presença ou ausência de *Colletotrichum truncatum* ou *Sclerotinia sclerotiorum*

Inóculo fitopatogênico	Tratamento
-	Água
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Água
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Água
-	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> (0,2%/peso das sementes)
-	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 10%
-	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 20%
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> (0,2%/peso das sementes)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 10%
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 20%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> (0,2%/peso das sementes)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 10%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Óleo essencial de <i>C. schoenanthus</i> 20%
-	Timorex Gold® 10%
-	Timorex Gold® 20%
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Timorex Gold® 10%
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Timorex Gold® 20%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Timorex Gold® 10%
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Timorex Gold® 20%
-	BISFP (0,2%/peso das sementes)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	BISFP (0,2%/peso das sementes)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	BISFP (0,2%/peso das sementes)
-	Trichodermil sc. (0,2%/peso das sementes)
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Trichodermil sc. (0,2%/peso das sementes)
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Trichodermil sc. (0,2%/peso das sementes)

3.6. Teste de sanidade

O teste foi feito através do método de papel de filtro, conforme descrito no “Manual de Análise Sanitária de Sementes” (BRASIL, 2009B), no qual as sementes foram dispostas de forma

equidistante em placas de Petri plástica, sobre três discos de papel de filtro previamente umedecidos com água destilada; cada tratamento conteve 200 sementes ao todo.

As placas contendo as sementes inoculadas com *C. truncatum* foram mantidas em câmara de incubação, à temperatura de 20 ± 2 °C, em regime alternado de 12 horas de luz fluorescente branca e 12 horas de escuro, durante 7 dias. Após este período foi contabilizada a porcentagem de sementes infectadas presentes em cada tratamento, com o auxílio de um estereomicroscópio e de um microscópio de luz, para posterior análise estatística a fim de avaliar uma possível redução do número de sementes infectadas pelo fitopatógeno. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 20 repetições por tratamento, cada qual contendo 10 sementes.

Já as placas contendo as sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* foram mantidas em câmara de incubação, à temperatura de 20 ± 2 °C, no escuro, durante 14 dias. Durante este período foi contabilizada a porcentagem de sementes infectadas presentes em cada tratamento a cada dois dias, de maneira ocular (parâmetro – presença de micélio branco cotonoso nas sementes, ou não), para posterior análise estatística a fim de avaliar uma possível redução do número de sementes infectadas pelo fungo. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, com 40 repetições por tratamento, cada qual contendo 5 sementes.

3.7. Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado de acordo com as Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009C), em papel de germinação umedecido com água destilada, na proporção de 2,5 vezes o peso do papel. Os rolos de germinação foram acondicionados em germinador à temperatura de 25°C (BRASIL, 2009C).

Como protocolado nas Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 2009C) para a cultura da soja, as sementes mortas/não germinadas, plântulas normais e plântulas anormais foram então, contadas em dois momentos. A primeira contagem de germinação (PCG) foi realizada 5 dias após a incubação dos rolos, onde identificou-se e quantificou-se plântulas normais, obtendo-se o vigor das sementes; a segunda contagem foi realizada após 8 dias de incubação, onde identificou-se e quantificou-se plântulas normais, anormais infectadas ou não, e sementes mortas infectadas ou não, nas quais era possível visualizar a presença do micélio de ambos os fitopatógenos nas sementes.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com 8 rolos de germinação contendo 25 sementes em cada de cada tratamento, sendo considerada a média de dois rolos uma repetição.

3.8. Teste de emergência

Caixas de 21 x 48 x 12 cm (L x C x A) foram preenchidas com substrato Basaplant® (turfa, corretivos, vermiculita, carvão vegetal e casca de Pinus), com a posterior semeadura de 50 sementes de soja por caixa (SILVA ET AL., 2014). Cada tratamento foi composto por quatro caixas, sendo cada caixa correspondente a uma repetição, totalizando 200 sementes por tratamento.

Após uma média de 6 dias, os cotilédones começaram a emergir (VC), e com isso iniciou-se a contagem diária do número de plântulas, que decorreu até a estabilização do número de emergência (3 dias seguidos contando o mesmo número de plântulas na repetição; SILVA ET AL., 2014). Quando foi estabilizada a emergência das plântulas, foi realizado o cálculo do Índice de velocidade de emergência (IVE) pela fórmula: $IVE = [(N1 G1) + (N2 G2) + \dots + (Nn Gn)] / (G1 + G2 + \dots + Gn)$, em que: IVE = índice de velocidade de emergência (dias); G = número de plântulas emergidas observadas em cada contagem; N = número de dias da semeadura a cada contagem, a fim de se observar quais repetições e tratamentos estabilizaram mais rápido (MAGUIRE, 1962).

Além deste cálculo, foi avaliada a porcentagem total de plântulas que emergiram por tratamento, a fim de comparar o efeito de cada tratamento sobre a quantidade total de plântulas finais.

3.9. Análise estatística

Os resultados das avaliações foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância, com auxílio do *software* “AgroEstat – Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos” (BARBOSA & MALDONADO, 2015).

4. EXPERIMENTO 1: ÓLEO ESSENCIAL DE *C. SCHOENANTHUS* (CAPIM-CAMELO) E TIMOREX GOLD® - RESULTADOS E DISCUSSÕES

Foram dadas siglas aos fitopatógenos, sendo: CTR = *Colletotrichum truncatum*; SSC = *Sclerotinia sclerotiorum*.

4.1. Teste de antagonismo *in vitro*

Conforme ilustrado na Tabela 3, pode-se observar o efeito das diferentes concentrações de óleo essencial e Timorex Gold, sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *C. truncatum* (CTR).

O óleo essencial de Capim-camelo apresentou a inibição total do crescimento micelial do fitopatógeno em suas duas dosagens. Já o produto comercial Timorex Gold, necessitou de dosagens mais elevadas para que alguma redução pudesse ser observada. Podemos constatar que houve uma mínima redução (0,5%) sob o crescimento micelial do fitopatógeno quando a dose de Timorex Gold foi de 15 µL e uma redução mais significativa, de 25%, quando a dose foi de 25 µL (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do óleo essencial de Capim-camelo (*C. schoenanthus*) ou Timorex Gold® sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum truncatum* (CTR).

CTR X Capim-camelo			CTR X Timorex Gold®		
Dose	Diâmetro micelial (mm)	Redução (%)	Dose	Diâmetro micelial (mm)	Redução (%)
Controle	7,29	a*	Controle	7,29	a
5 µL	0	b	15 µL	7,25	a
15 µL	0	b	25 µL	5,46	b
CV %	0,3795		CV %	0,6431	

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Estes resultados corroboram com Souza Júnior et al. (2009), que avaliaram o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre o fitopatógeno *Colletotrichum gloesporioides*, sob as concentrações de 1, 3, 5 e 10 µL, e observaram 100% de inibição do crescimento micelial *in vitro*. Barbosa et al. (2015) observaram atividade fungicida do óleo puro de *Melaleuca* sp. sobre *Colletotrichum musae* nas concentrações de 50, 75, 100 e 125 µL /L. Assim como Marinelli et al. (2012) que verificaram uma inibição total do crescimento micelial de *C. gloesporioides* quando o

óleo puro de *Melaleuca* sp. esteve sob uma concentração de 0,46%. Ambos os resultados também corroboram com o obtido neste estudo, uma vez que, no presente, não está sendo utilizado o óleo puro, mas sim um produto formulado.

Através da figura 9 podemos observar a inibição total do crescimento micelial do fitopatógeno em ambas as dosagens do óleo essencial de Capim-camelo. Pela figura 10 conseguimos constatar que a dosagem de 15 μL de Timorex Gold interferiu minimamente no crescimento micelial de *C. truncatum*, e que a dosagem de 50 μL causou uma redução mais significativa sob o crescimento micelial do mesmo.

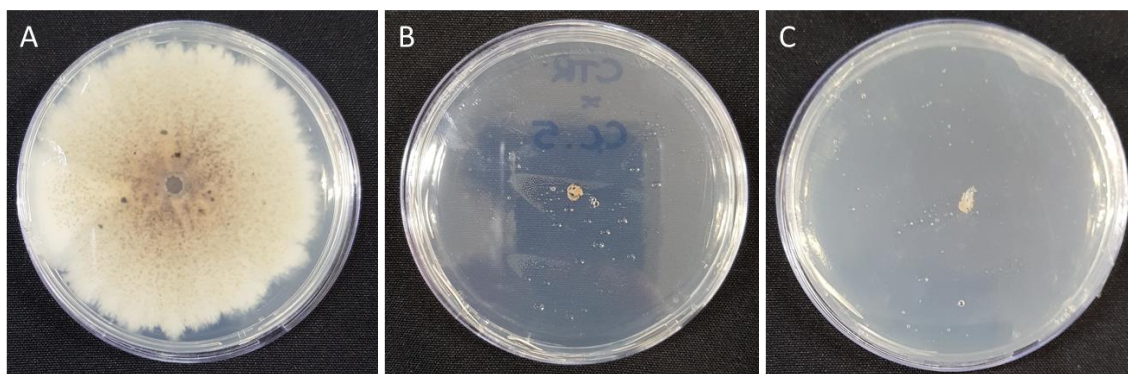


Figura 9: Aspecto da colônia de *C. truncatum* em placa de petri (A) - controle; *C. truncatum* em placa de petri que continha 5 μL de óleo essencial de Capim-camelo espalhados em sua superfície (B); *C. truncatum* em placa de petri que continha 15 μL de óleo essencial de Capim-camelo espalhados em sua superfície (C). Fotos tiradas após 7 dias.

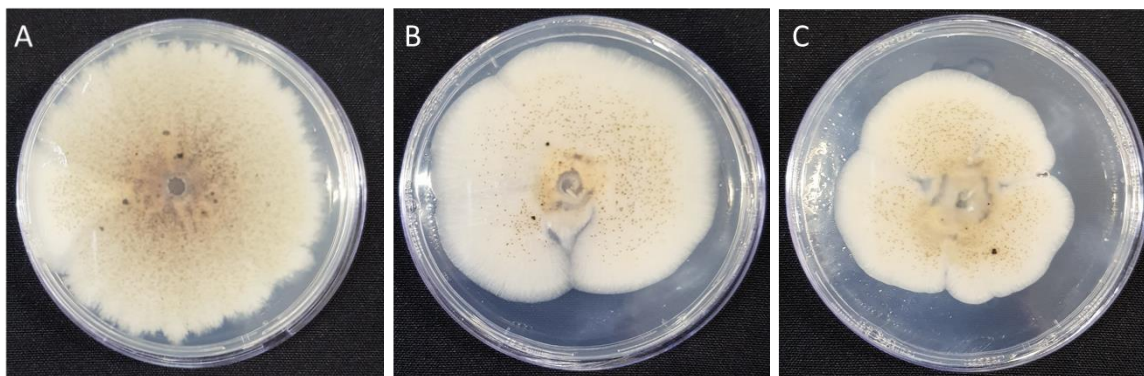


Figura 10: Aspecto da colônia de *C. truncatum* em placa de petri (A) - controle; *C. truncatum* em placa de petri que continha 15 μL de Timorex Gold® espalhados em sua superfície (B); *C. truncatum* em placa de petri que continha 25 μL de Timorex Gold® espalhados em sua superfície (C). Foto tirada após 7 dias.

Conforme ilustrado na Tabela 4, pode-se observar o efeito das diferentes concentrações de óleo essencial e Timorex Gold, sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *S. sclerotiorum* (SSC).

Novamente o óleo essencial de Capim-camelo apresentou a inibição total do crescimento micelial do fitopatógeno em suas duas dosagens. Já o produto comercial Timorex

Gold, necessitou de dosagens ainda mais elevadas que o teste envolvendo *C. truncatum* para que alguma redução sob o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* pudesse ser observada. Lembrando que no teste envolvendo o outro fitopatógeno, as dosagens já haviam sido aumentadas. Podemos constatar que não houve redução do crescimento micelial quando a dose de Timorex Gold foi de 25 µL e que houve uma redução mais significativa, de 36,8%, quando a dose foi de 50 µL (Tabela 4).

Tabela 4: Efeito do óleo essencial de Capim-camelo (*C. schoenanthus*) ou Timorex Gold® sobre o crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (SSC).

SSC X Capim-camelo			SSC X Timorex Gold®		
Dose	Diâmetro micelial (mm)	Redução	Dose	Diâmetro micelial (mm)	Redução
Controle	8,6	a*	Controle	8,6	a
5 µL	0	b	25 µL	8,6	a
15 µL	0	b	50 µL	5,43	b
CV %	0,0974		CV %	2,4521	

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Estes resultados corroboram com Queiroz et al. (2020), que relataram a inibição de 100% do crescimento de *S. sclerotiorum* quando em contato com os óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*) e capim cidreira (*Cymbopogon citratus*). Utilizando o óleo essencial de *Melaleuca* sp. Steffen et al. (2019), verificaram um efeito antifúngico sobre *S. sclerotiorum* em testes in vitro, com uma inibição de 100% do desenvolvimento micelial sob a concentração de 0,5% em 72 horas. A diferença entre este experimento e o presente é que aqui utilizamos um produto formulado que contém óleo essencial de *M. alternifolia*, no caso o Timorex Gold®, logo o óleo não está nas mesmas condições (puro) como foi estudado por Steffen et al. (2019) e os resultados são mais sutis em relação a redução do crescimento micelial do fungo.

Através da figura 11 podemos observar a inibição total do crescimento micelial do fitopatógeno em ambas as dosagens do óleo essencial de Capim-camelo. Pela figura 12 conseguimos constatar que a dosagem de 25 µL de Timorex Gold não interferiu no crescimento micelial do fungo, e que apenas quando este produto esteve a 50 µL causou certa redução em seu crescimento micelial.

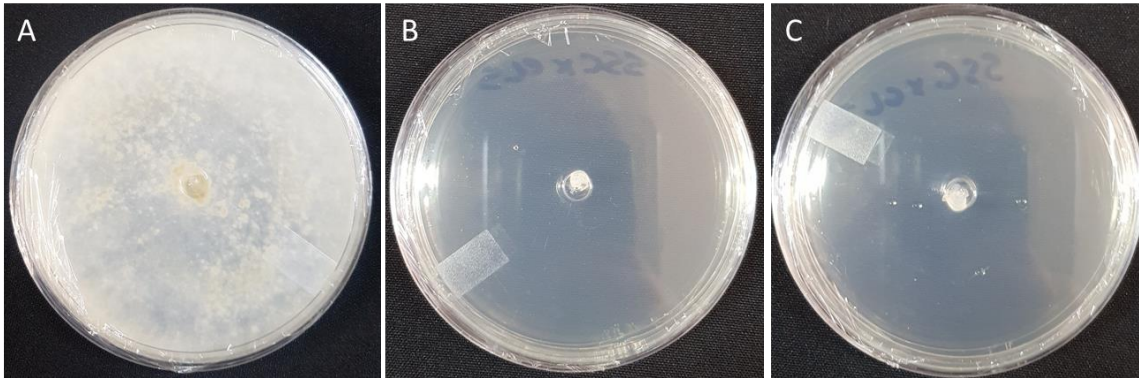


Figura 11: Aspecto da colônia de *S. sclerotiorum* em placa de petri (A) - controle; *S. sclerotiorum* em placa de petri que continha 5 μL de óleo essencial de Capim-camelo espalhados em sua superfície (B); *S. sclerotiorum* em placa de petri que continha 15 μL de óleo essencial de Capim-camelo espalhados em sua superfície (C). Foto tirada após 7 dias.

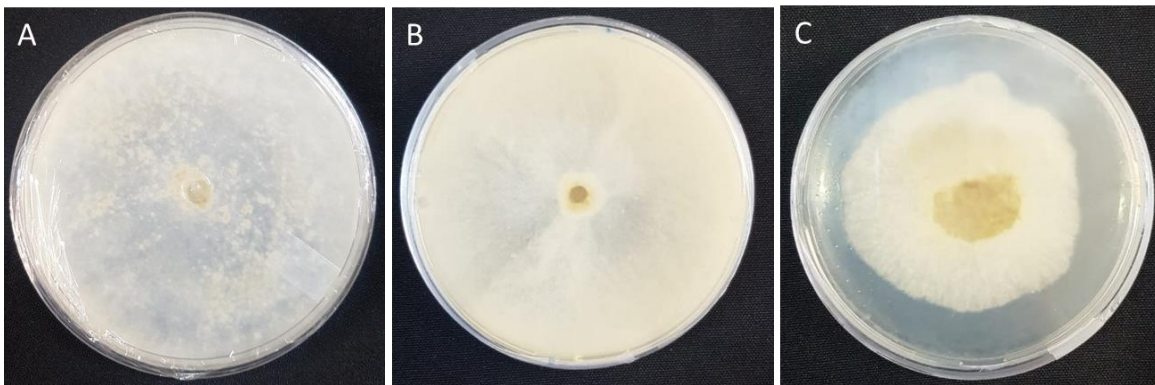


Figura 12: Aspecto da colônia de *S. sclerotiorum* em placa de petri (A) - controle; *S. sclerotiorum* em placa de petri que continha 25 μL de Timorex Gold® espalhados em sua superfície (B); *S. sclerotiorum* em placa de petri que continha 50 μL de Timorex Gold® espalhados em sua superfície (C). Foto tirada após 7 dias.

4.2. Teste de sanidade

Após a inoculação das sementes com o fitopatógeno *C. truncatum*, e feita a mistura com 50% de sementes sadias, obteve-se 97% de sementes contaminadas na testemunha. Na análise sanitária das sementes tratadas, todos os tratamentos mostraram-se eficientes no controle do fitopatógeno.

Conforme representado na Tabela 5, o óleo essencial foi o que apresentou a maior redução, tanto na concentração a 10%, com uma porcentagem de sementes contaminadas de 6%, quanto na concentração a 20%, apresentando uma porcentagem de sementes contaminadas de 5%.

Tabela 5: Porcentagem de sementes contaminadas com *Colletotrichum truncatum* (CTR) em cada tratamento. Tratamentos envolvendo óleo essencial de Capim-camelo (C.C.) e Timorex Gold® (Timo).

Tratamento		Incidência de infecção (%)
T1	CTR	97 a
T2	CTR x C.C. 10%	6 c
T3	CTR x C.C. 20%	5 c
T4	CTR x Timo 10%	30 b
T5	CTR x Timo 20%	26 b
CV %		3,611

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Foi constatado por Daronco et al. (2015) que o tratamento de sementes de soja com o óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* promoveu uma inibição de 52% na incidência de *Fusarium* sp. quando comparado a testemunha sadia. Seneme et al. (2019) relataram a redução da infestação de alguns fungos fitopatogênicos em sementes de sorgo, quando estas foram tratadas com óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. Também utilizando o óleo essencial de *C. citratus*, Sarmento-Brum et al. (2014) constataram que a partir de uma concentração de 0,5 µL/mL, houve uma inibição do crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Sclerotium rolsfii*.

Martins et al. (2010) verificaram uma atividade fungicida, com 100% de inibição de crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* quando em contato com 0,4% de óleo essencial de *Melaleuca* sp., sendo que a partir da concentração 0,2% o fungo já havia apresentado sensibilidade ao óleo. A oportunidade do uso de óleos essenciais no controle de fitopatógenos também foi apontada por Morais et al. (2008A), que mostraram a atividade fungicida de óleos essenciais do gênero *Cymbopogon* sp. em sementes de feijão.

Após a inoculação das sementes com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, e feita a mistura com 50% de sementes sadias, obteve-se 70% de sementes contaminadas na testemunha (T1). Na análise sanitária das sementes tratadas, todos os tratamentos mostraram-se eficientes no controle do fitopatógeno.

Conforme representado na Tabela 6, o óleo essencial de Capim-camelo foi o que apresentou as maiores reduções no número de sementes contaminadas. Quando o óleo esteve nas concentrações de 10% (T2) e 20% (T3), apresentou uma porcentagem de sementes contaminadas de 22% e 19%, respectivamente.

O uso do Timorex Gold® também proporcionou certa redução na porcentagem de sementes contaminadas, sendo 54% quando o produto estava a uma concentração de 10% (T4), e 33% quando ele estava a uma concentração de 20% (T5).

Tabela 6: Porcentagem de sementes contaminadas com *Sclerotinia sclerotiorum* (SSC) em cada tratamento. Tratamentos envolvendo óleo essencial de Capim-camelô (C.C.) e Timorex Gold® (Timo).

Tratamento		Incidência do fitopatôgeno (%)	
T1	SSC	70	a
T2	SSC X C.C. 10%	22	c
T3	SSC X C.C. 20%	19	c
T4	SSC X Timo 10%	54	ab
T5	SSC X Timo 20%	33	bc

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

4.3. Teste de germinação

A primeira contagem de germinação do teste (PCG) baseia-se do princípio de que as amostras com maior porcentagem de plântulas normais são mais vigorosas (NAKAGAWA, 1999). Vale observar que o tratamento que apresentou o melhor ou o pior vigor não é, necessariamente, o mesmo tratamento que apresentou a melhor ou a pior germinação.

Na tabela 7, observa-se que a inoculação de *C. truncatum* afetou significativamente a germinação das sementes, sendo que, na testemunha sadia (T1), a porcentagem foi de 88% e, na testemunha inoculada (T2) de 36,5%.

Com exceção do tratamento T6 (semente sadia + Timorex Gold 20%) todos os demais tratamentos afetaram a germinação das sementes. O tratamento T8 (sementes inoculadas + óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus* a 20%) apresentou a pior germinação, com uma porcentagem de 2%, seguido do tratamento T7 (sementes inoculadas + óleo essencial de *C. schoenanthus* a 10%), com uma porcentagem de germinação de 20,5%. Estes dois tratamentos (T7 e T8) foram estatisticamente, piores que o tratamento testemunha inoculada (T2).

Os demais tratamentos, que envolveram o óleo essencial (T3 e T4) também apresentaram uma germinação baixa, indicando uma possível fitotoxicidade sobre a qualidade fisiológica das sementes. O que corrobora com o Isman (2000), que afirma que os óleos essenciais mais eficientes, quando em altas concentrações, podem apresentar fitotoxicidade. Já os autores Mieth et al. (2007) e Souza et al. (2010) afirmam sobre a eficiência de produtos naturais no controle de patógenos e no aumento do poder germinativo de sementes, tudo depende da dosagem utilizada.

Em um experimento realizado por Morais et al. (2008B), foi constatado que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *C. flexuosus* e *Melaleuca* sp. reduziram a ocorrência de *Phomopsis* sp. nas sementes de soja tratadas. Ainda no experimento de Morais et al. (2008A) foi relatado que o

óleo essencial de *C. flexuosus* apresentou atividade inibitória sobre o fitopatógeno *C. truncatum*. O tratamento de sementes, predispostas à ação de microrganismos, potencializa a longevidade das sementes, seu poder germinativo e vigor ao reduzir a capacidade de sobrevivência dos fitopatógenos (CARVALHO ET AL., 1999).

Tabela 7: Porcentagem de plântulas normais por tratamento, na primeira contagem (PCG); porcentagem de plântulas normais na segunda contagem (Germinação); porcentagem de plântulas anormais na segunda contagem; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas na segunda contagem do teste envolvendo o fitopatógeno *C. truncatum*. CTR = *Colletotrichum truncatum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelo; Timo = Timorex Gold; CV = coeficiente de variação.

	Tratamento	PCG (%)	Germinação (%)	Plântulas anormais (%)	Sementes mortas (%)
T1	Água	83 a	88 ab	4 d	8 de
T2	CTR	35,5 bc	36,5 d	40 a	23,5 c
T3	C.C. 10%	33 c	62 c	17,2 bc	21 c
T4	C.C. 20%	31 c	58 c	26 ab	16 cd
T5	Timo 10%	60 b	82 b	12 c	6 ef
T6	Timo 20%	86 a	95 ab	4 d	1 f
T7	CTR x C.C. 10%	12,5 cd	20,5 e	34 a	45,52 b
T8	CTR x C.C. 20%	1,5 d	2 f	17,2 bc	81 a
T9	CTR x Timo 10%	46,5 bc	58 c	26 ab	19,5 cd
T10	CTR x Timo 20%	57,5 b	58 c	25,2 ab	14,5 cde
	CV %	7,807	7,487	32,477	43,236

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Os parâmetros utilizados nas avaliações foram embasados sobre a qualidade e aspecto das plântulas de soja. Quando a plântula estava sem danos no cotilédone e com crescimento radicular regular, ela foi considerada normal (Figura 13 – A). As plântulas que foram consideradas anormais (Figura 13 – B e C) apresentaram crescimento radicular prejudicado e/ou danos em mais de 50% da superfície dos cotilédones. As sementes mortas por sua vez, foram aquelas que não apresentaram nenhuma atividade de germinação, estando na maioria dos casos amolecidas (Figura 13 – D).



Figura 13: Aspecto das sementes e plântulas constantes da Tabela 7. Plântula normal (A); Plântulas anormais (B e C) e Semente morta (D), do teste realizado com *C. truncatum*. Fotos tiradas após 8 dias do início do experimento.

Os componentes do óleo essencial, sozinhos ou em ação conjunta, podem possuir um potencial herbicida, inibindo a germinação de sementes e o crescimento de plântulas (PAWLOWSKI ET AL., 2021). Em um estudo realizado por Santos (2018) foi constatado que a concentração de 0,25% de óleo essencial de cravo resultou em uma boa germinação e um satisfatório controle de *Macrophomina phaseolina*, no entanto, quando em concentrações superiores, a germinação foi afetada negativamente. Ainda a respeito do efeito fitotóxico, Ajayi et al. (2014) chegaram à conclusão de que esta tende a diminuir com o tempo em sementes armazenadas, devido à biodegradação dos óleos essenciais.

No teste envolvendo o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, pode-se observar pela tabela 8 que, a inoculação do fitopatógeno afetou significativamente a germinação das sementes, sendo que, na testemunha sadia (T1), a porcentagem foi de 98% e, na testemunha inoculada (T2) de 61%.

No entanto, a maioria dos tratamentos não afetou a germinação das sementes, com exceção dos tratamentos T4 (semente sadia + óleo essencial a 20%) e T8 (semente inoculada + óleo essencial a 20%). Neste caso, ambos os tratamentos prejudicaram a germinação das sementes, refletindo nas maiores porcentagens de plântulas anormais.

Embora a germinação total não tenha sido prejudicada na maioria dos tratamentos, é importante observar que nestes ocorreu um atraso na primeira contagem da germinação, indicando uma redução no vigor das sementes.

Novamente vemos que estes resultados podem indicar uma possível fitotoxicidade do óleo essencial de *C. schoenanthus* sobre a qualidade fisiológica das sementes, uma vez que a testemunha inoculada (T2) está, estatisticamente igual ao tratamento T4, e o tratamento T8 apresentou a menor porcentagem de germinação.

A redução na germinação das sementes de soja no presente experimento, ocasionada pela maior concentração de óleo essencial de Capim-camelo, ganha sentido com o que foi

relatado por Giepen et al. (2018). Em sua afirmação, Giepen et al. (2018) relatam que em muitos países é comum o uso e o desenvolvimento de herbicidas com óleos essenciais, uma vez que dependendo de sua dosagem, possui efeito fitotóxico.

Hillen et al. (2012) observaram que a exposição de sementes de soja a voláteis de *Cymbopogon martini* prejudica a germinação. Visto isso, Nascimento et al. (2021) recomenda que o tratamento de sementes com óleos essenciais para fins fitossanitários deve considerar o composto selecionado, a semente a ser tratada, o tempo de exposição e a técnica de tratamento.

Tabela 8: Porcentagem de plântulas normais por tratamento, na primeira contagem (PCG); porcentagem de plântulas normais na segunda contagem (Germinação); porcentagem de plântulas anormais na segunda contagem; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas na segunda contagem do teste envolvendo o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. SSC = *S. sclerotiorum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelo; Timo = Timorex Gold®; CV = coeficiente de variação.

	Tratamento	PCG (%)	Germinação (%)	Plântulas anormais (%)	Sementes mortas (%)
T1	Água	98 a	98 a	1 e	1 b
T2	SSC	59 c	61 ab	24 bc	17 a
T3	C.C. 10%	58 c	94 a	6 d	0 b
T4	C.C. 20%	4 e	58 ab	29 b	13 a
T5	Timo 10%	83 ab	100 a	0 e	0 b
T6	Timo 20%	69 bc	95 a	5 d	0 b
T7	SSC x C.C. 10%	40 d	88 a	12 cd	0 b
T8	SSC x C.C. 20%	9 e	37 b	63 a	0 b
T9	SSC x Timo 10%	68 c	73 a	22 bc	6 a
T10	SSC x Timo 20%	65 c	73 a	21 bc	9 a
	CV %	10,541	3,1232	40,19	102,84

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

A escala de danos utilizada aqui é igual a utilizada no experimento envolvendo *C. truncatum*. Quando a plântula estava sem danos no cotilédone e com crescimento radicular regular, ela foi considerada normal (Figura 14 – A). As plântulas que foram consideradas anormais (Figura 14 – B e C) apresentaram crescimento radicular prejudicado e/ou danos em mais de 50% da superfície dos cotilédones. As sementes mortas por sua vez, foram aquelas que não apresentaram nenhuma atividade de germinação, estando na maioria dos casos amolecidas (Figura 14 – D).

Ainda na figura 14 podemos observar a presença do fitopatógeno infectando a plântula anormal (B) e a semente morta (D).

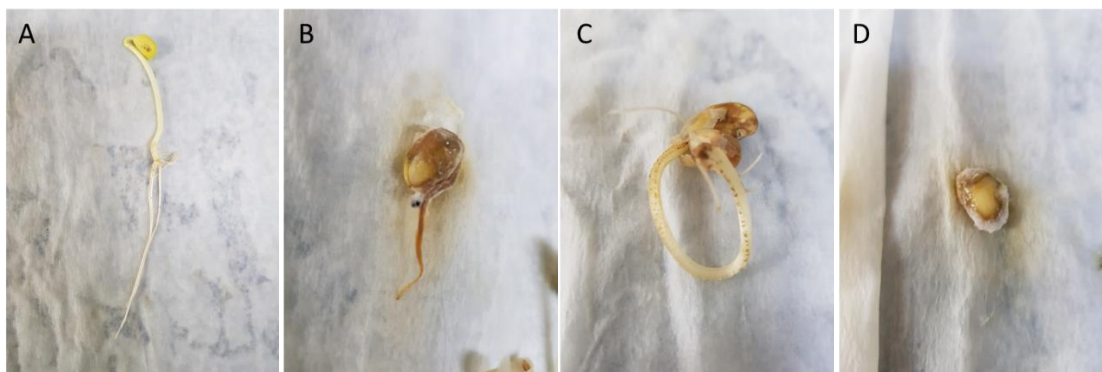


Figura 14: Aspecto das sementes e plântulas constantes da Tabela 8. Plântula normal (A); Plântulas anormais (B e C); Semente morta (D), do teste realizado com *S. sclerotiorum*. Fotos tiradas após 8 dias do início do experimento.

4.4. Teste de emergência

Para o fitopatógeno *C. truncatum*, conforme representado na tabela 9, estatisticamente os tratamentos que apresentaram o melhor índice de velocidade de emergência (IVE) das plântulas foram a testemunha sadia (T1), os tratamentos que envolviam as sementes sadias tratadas com Timorex Gold nas concentrações de 10% (T5) e 20% (T6), e a testemunha inoculada (T2). O tratamento que apresentou o pior IVE foi o que envolvia sementes previamente inoculadas com *C. truncatum* e a maior concentração do óleo essencial de *C. schoenanthus* (T8).

Podemos constatar uma possível fitotoxicidade do óleo essencial de *C. schoenanthus*, uma vez que os quatro tratamentos que o envolveram (T3; T4; T7 e T8) tiveram os menores valores de IVE, e da porcentagem de número de sementes que emergiram.

Pela tabela 9 também podemos observar que, estatisticamente, o tratamento que apresentou a melhor porcentagem de emergência foi o que envolveu sementes sadias tratadas com Timorex Gold a 20% (T6). Os tratamentos envolvendo o óleo essencial de *C. schoenanthus* (T3, T4, T7 e T8) apresentaram as piores porcentagens de emergência, reforçando a hipótese de uma possível fitotoxicidade do óleo sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Corroborando com a hipótese de fitotoxicidade, Magalhães et al. (2013) demonstraram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* reduziu a porcentagem de emergência e o IVE de sementes de alface. Em um estudo semelhante, Souza et al. (2005) também relataram a redução na porcentagem de emergência e no IVE de sementes de alface e de rúcula quando tratadas com o óleo de *C. citratus*. No entanto, Araújo et al. (2012), mostram em seus resultados que o óleo essencial de *Cymbopogon winterianus* não interferiu no IVE das sementes de Funcho, mostrando que a fitotoxicidade varia conforme o tipo do óleo e da espécie vegetal.

Vale observar que o produto Timorex Gold composto por óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, na concentração de 20% em sementes sadias resultou na melhor porcentagem de emergência. Corroborando com o estudo realizado por Mariano et al. (2014), no qual revelou o benefício que a correta dosagem do óleo de *M. alternifolia* possui no IVE de sementes de girassol, além da melhoria na qualidade fitossanitária.

Tabela 9: Porcentagem de emergência de plântulas; índice de velocidade de emergência (IVE), por tratamento do teste envolvendo o fitopatógeno *C. truncatum*. CTR = *C. truncatum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelo; Timo = Timorex Gold; CV = coeficiente de variação.

Tratamentos		Emergência (%)	IVE
T1	Água	86 ab	7,79 a
T2	CTR	61 abc	5,78 ab
T3	C.C. 10%	30 cd	2,40 c
T4	C.C. 20%	44 bc	3,25 bc
T5	Timo 10%	68 abc	6,29 ab
T6	Timo 20%	81 a	5,28 ab
T7	CTR x C.C. 10%	43 bc	4,22 abc
T8	CTR x C.C. 20%	8 d	0,66 d
T9	CTR x Timo 10%	71 abc	4,52 abc
T10	CTR x Timo 20%	65 abc	5,17 abc
CV (%)		7,039	29,359

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Quando o fitopatógenos em questão foi a *S. sclerotiorum*, observa-se na tabela 10 que, estatisticamente os tratamentos que apresentaram o melhor índice de velocidade de emergência (IVE) das plântulas foram a testemunha sadia (T1) e a testemunha inoculada (T2).

Os tratamentos que apresentaram o pior IVE foram os que envolviam sementes previamente inoculadas com *S. sclerotiorum* e tratadas com as concentrações de óleo essencial de Capim-camelo a 10% (T7) e 20% (T8). Tal resultado pode, novamente, indicar fitotoxicidade sobre a qualidade fisiológica das sementes, uma vez que os quatro tratamentos que envolveram o óleo essencial de Capim-camelo (T3; T4; T7 e T8) tiveram os menores valores de IVE.

De acordo com a tabela 10, estatisticamente os tratamentos que apresentaram as melhores porcentagens de emergência foram a testemunha sadia (T1) e o tratamento de sementes sadias com 20% de Timorex Gold (T6). As piores porcentagens novamente envolvem os tratamentos que continham o óleo essencial de Capim-camelo (T3, T4, T7 e T8), reforçando a hipótese de uma possível fitotoxicidade sobre a qualidade fisiológica das sementes.

Tabela 10: Porcentagem de emergência de plântulas; índice de velocidade de emergência (IVE), por tratamento do teste envolvendo o fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*. SSC = *S. sclerotiorum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelo; Timo = Timorex Gold; CV = coeficiente de variação.

Tratamentos		Emergência (%)	IVE
T1	Água	86 a	7,79 a
T2	SSC	77 ab	7,12 a
T3	C.C. 10%	30 c	2,40 c
T4	C.C. 20%	44 bc	3,25 bc
T5	Timo 10%	68 ab	6,29 ab
T6	Timo 20%	81 a	5,28 ab
T7	SSC x C.C. 10%	2 d	0,15 d
T8	SSC x C.C. 20%	1 d	0,04 d
T9	SSC x Timo 10%	54 abc	4,63 abc
T10	SSC x Timo 20%	71 ab	6,06 ab
CV (%)		16,12	31,947

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Ficou claro que óleos essenciais podem interferir positiva ou negativamente sobre a qualidade fisiológica das sementes, tudo depende de fatores como o tipo de óleo essencial, a dosagem e a espécie vegetal tratada. Em um estudo realizado por Teixeira et al. (2013) foi verificado que a porcentagem de emergência e o IVE de sementes de milho não variaram significativamente quando tratadas com 1% de óleo de *Cymbopogon winterianus* ou 0,1% de óleo de *C. citratus*. Já Olinto et al. (2021), relataram que o óleo essencial de *M. alternifolia* reduziu o percentual de incidência de fungos associados às sementes de *Leucaena leucocephala*, porém também reduziu a qualidade fisiológica delas.

5. EXPERIMENTO 2: ÓLEO ESSENCIAL DE *C. SCHOENANTHUS* (CAPIM-CAMELO), BISFP E TRICHODERMIL SC.[®] – RESULTADOS E DISCUSSÕES

O experimento 2 foi realizado com óleo essencial de Capim-camelô (*C. schoenanthus*), BISFP e de Trichodermil sc.[®] na concentração de 0,2% pelo peso das sementes.

Foram dadas siglas aos fitopatógenos, sendo: CTR = *Colletotrichum truncatum*; SSC = *Sclerotinia sclerotiorum*.

5.1. Teste de antagonismo *in vitro*

Conforme representado na Tabela 11, pode-se observar o efeito das diferentes dosagens de BISFP sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *C. truncatum* (CTR).

O produto BISFP não apresentou redução no crescimento micelial do fitopatógeno quando esteve na dose de 5 µL, no entanto quando a dose foi de 10 µL, podemos observar uma redução de 34% sobre o crescimento no diâmetro micelial do fungo.

Como dito anteriormente, o produto BISFP é composto por ácidos orgânicos, extrato de levedura (fungos unicelulares), extrato de algas, aminoácidos e vitaminas. Botha (2011) explica a respeito do amensalismo, um mecanismo antagônico sobre fitopatógenos comumente encontrados em leveduras. Este mecanismo ocorre por meio de secreções de toxinas extracelulares, liberadas pelas leveduras, que possuem efeito fungicida sobre uma ampla gama de fitopatógenos (BOTHÁ, 2011). Buzzini e Martini (2000), afirmam que esta atividade é um fenômeno encontrado em diferentes espécies e isolados de leveduras provenientes de diversificados habitats.

Em um estudo realizado por Coelho et al. (2009), foi observada uma forte atuação da levedura *Kodameae obmeri* no retardamento do desenvolvimento de *Penicillium expansum*. Trabalhos realizados por El Tarabily e Sisvasithempam (2006) envolvendo diferentes gêneros de leveduras, como a *Candida* spp., demonstraram uma grande variedade de compostos produzidos, pelas leveduras, relacionados à antibiose sobre fitopatógenos fúngicos. De acordo com El Tarabily e Sisvasithempam (2006), há um reconhecimento de exsudatos, provenientes de hifas de fitopatógenos, pelas leveduras, sendo este processo extremamente importante para a predação destes microrganismos. El Mehalawy (2004) demonstrou que foram encontrados dez compostos químicos nos filtrados de *Candida steatolytica*, todos apresentando efeito inibidor no crescimento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Tabela 11: Efeito de BISFP sobre o crescimento micelial do fungo *Colletotrichum truncatum* (CTR).

CTR X BISFP			
Dose	Diâmetro micelial (mm)		Redução
Controle	6,9	a	-
5 µL	7,6	a	-
10 µL	5	a	34%
CV (%)	30,616		

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Através da figura 15 podemos observar que a dosagem de 5 µL de BISFP não interferiu no crescimento micelial de *C. truncatum*, e que a dosagem de 10 µL deste mesmo produto, causou uma redução significativa sob o crescimento micelial do fungo.

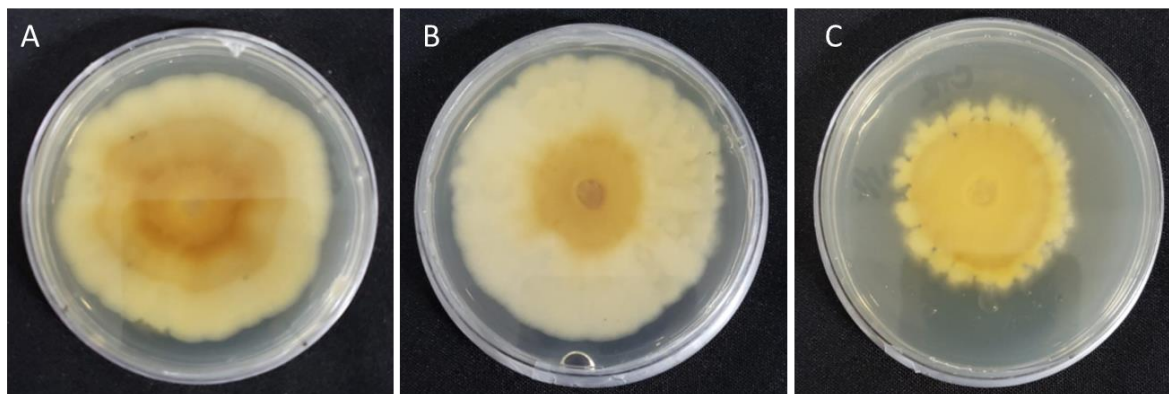


Figura 15: Aspecto da colônia de *C. truncatum* em placa de petri (A) - controle; *C. truncatum* em placa de petri que continha 5 µL de BISFP espalhados em sua superfície (B); *C. truncatum* em placa de petri que continha 10 µL de BISFP espalhados em sua superfície (C). Fotos tiradas após 7 dias.

Pela Tabela 12, pode-se observar o efeito das diferentes dosagens de BISFP sobre o crescimento micelial do fitopatógeno *S. sclerotiorum*.

As placas contendo BISFP sob as dosagens de 5 µL e 10 µL, não apontaram redução no crescimento micelial de *S. sclerotiorum* (SSC).

Tabela 12: Efeito de BISFP sobre o crescimento micelial do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (SSC).

SSC X BISFP			
Dose	Diâmetro micelial (mm)		Redução
Controle	8,6	a	
5uL	8,6	a	0%
10uL	8,6	a	
CV%			

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Através da figura 16 podemos observar que ambas as dosagens de BISFP (5 μ L e 10 μ L) não interferiram no crescimento micelial de *S. sclerotiorum*.

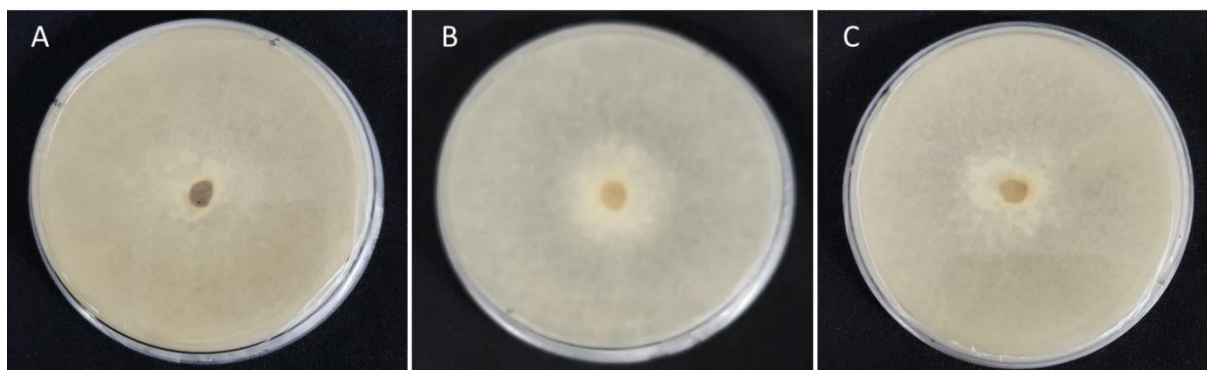


Figura 16: Aspecto da colônia de *S. sclerotiorum* em placa de petri (A) – controle; *S. sclerotiorum* em placa de petri que continha 5 μ L de BISFP espalhados em sua superfície (B); *S. sclerotiorum* em placa de petri que continha 10 μ L de BISFP espalhados em sua superfície (C). Foto tirada após 7 dias.

Com base nas evidências apresentadas, fica claro que o uso de algas marinhas e leveduras na agricultura são ferramentas interessantes, apresentando bom desempenho como bioestimulantes em plantas, assim como no controle de alguns fitopatógenos. O uso desses organismos tem aumentado, principalmente por serem uma alternativa ecologicamente correta ao uso de fertilizantes. O produto BISFP contém esses dois organismos, demonstrando seu potencial.

5.2. Teste de sanidade

Após a inoculação das sementes com o fitopatógeno *C. truncatum*, e feita a mistura com 50% de sementes sadias, obteve-se 93% de sementes contaminadas na testemunha. Na análise sanitária das sementes tratadas, todos os tratamentos mostraram-se eficientes no controle do fitopatógeno.

Conforme representado na Tabela 13, o óleo essencial de *C. schoenanthus* e o produto Trichodermil sc. foram os tratamentos que apresentaram as maiores reduções na porcentagem de sementes contaminadas, 24% e 33%, respectivamente. O produto BISFP (T4) não se destacou como os outros dois tratamentos, no entanto apresentou redução significativa, com um percentual de sementes contaminadas de 49%.

Em um estudo realizado por Machado e Bettioli (2010) foi relatado a respeito das leveduras como um importante aliado no controle de doenças, uma vez que desempenham diferentes mecanismos antagônicos como a antibiose, competição por espaço e nutrientes, parasitismo e promoção de crescimento. Além destes mecanismos, Zanardo et al. (2009)

demonstraram a indução de resistência em plantas promovida por leveduras, e Mukherjee e Sen (2015) relataram seu potencial em produzir bioativos importantes, tais como fitormônios, aminoácidos e enzimas.

A redução da severidade do crestamento bacteriano do feijoeiro por algumas leveduras, sendo uma destas a *Sporidiobolus johnsonii*, foi observado por Carvalho (2017), que constatou a atuação das leveduras como indutoras de crescimento. O potencial das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporidiobolus johnsonii* e *Zygoascus hellenicus*, foi avaliado a campo e constatado por Calixto (2020), quanto ao efeito sobre a incidência de antracnose e produtividade da cultura da soja.

Tabela 13: Efeito do óleo essencial de Capim-camelo (*C. schoenanthus*) ou Trichodermil sc.[®] ou BISFP sobre a incidência de *Colletotrichum truncatum* (CTR) nas sementes.

Tratamento		Incidência do fitopatógeno (%)
T1	CTR	93 a
T2	CTR x C.C.	24 c
T3	CTR x Tricho	33 c
T4	CTR x BISFP	49 b
CV%		14,02

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Realizada a inoculação das sementes com o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, e feita a mistura com 50% de sementes sadias, obteve-se 68,5% de sementes contaminadas na testemunha. Na análise sanitária das sementes tratadas, apenas o tratamento que envolveu sementes inoculadas e tratadas com Trichodermil sc. (T3), apresentou uma redução significativa na porcentagem de sementes contaminadas, de 52%.

Conforme representado na Tabela 13, o tratamento com óleo essencial (T2) não diferiu estatisticamente da testemunha (T1), sendo as porcentagens de sementes contaminadas de ambos de 68,5%. O produto BISFP (T4) apresentou uma porcentagem de sementes contaminadas de 70%, sendo o tratamento menos eficaz no controle do fitopatógeno.

Através de microscopia eletrônica de varredura, Rezende (2011) evidenciou o mecanismo de hiperparasitismo, por estrangulamento e penetração de hifas, do *Trichoderma* spp. em *S. sclerotiorum*. Rezende (2011) também realizou o tratamento de sementes com o produto Trichodermil sc., com o qual alcançou 40% de redução da incidência de *S. sclerotiorum* quando comparado a testemunha inoculada.

Apesar do hiperparasitismo de hifas ser importante na interação com o fitopatógeno, este mecanismo por si só não garante o sucesso no controle biológico (ALMEIDA ET AL., 2007). Há a menção de que a ação sinérgica atribuída à produção de enzimas e antibióticos, simultaneamente, possa esclarecer o sucesso da interação. Como dito por Reino et al. (2008), o principal interesse é nos compostos que apresentam atividade antibiótica e que, provavelmente, implicam na eficácia do isolado como agente de biocontrole.

Tabela 14: Efeito do óleo essencial de Capim-camelo (*C. schoenanthus*) ou Trichodermil sc.[®] ou BISFP sobre a incidência de *Sclerotinia sclerotiorum* (SSC) nas sementes.

Tratamento	Incidência do fitopatógeno (%)	
T1 SSC	68,5	ab
T2 SSC x C.C.	68,5	ab
T3 SSC x Tricho	52	b
T4 SSC x BISFP	70	a
CV%	45,129	

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

5.3. Teste de germinação

A primeira contagem de germinação do teste (PCG) baseia-se do princípio de que as amostras com maior porcentagem de plântulas normais são mais vigorosas (NAKAGAWA, 1999). Vale ressaltar que o tratamento que apresentou o melhor ou o pior vigor, não é, necessariamente, o mesmo tratamento que apresentou a melhor ou a pior germinação.

Na tabela 15, observa-se que a inoculação de *C. truncatum* afetou significativamente a germinação das sementes sendo que, na testemunha sadia (T1), a porcentagem foi de 92% e, na testemunha inoculada (T2) de 26%. No entanto, o tratamento que teve a maior porcentagem de sementes mortas foi o T6 (sementes inoculadas + óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus*).

Com exceção do tratamento T5 (semente sadia + BISFP) todos os demais tratamentos afetaram, significativamente a germinação das sementes. O tratamento T2, por sua vez, apresentou a maior porcentagem de plântulas anormais (56%), e a pior porcentagem de germinação (26%).

Os tratamentos contendo o fitopatógeno, quando tratados com óleo essencial (T6), com Trichodermil sc. (T7) ou com BISFP (T8) apresentaram menores porcentagens do número de plântulas anormais com sinais e sementes mortas com sinais em comparação a testemunha inoculada (T2), a nível estatístico. Além de terem apresentado uma porcentagem de germinação

de plântulas normais melhor do que o tratamento T2, indicando que houve controle do fitopatógeno, resultando em uma melhor germinação das sementes.

No experimento 1 vimos que a concentração de óleo essencial deve ser bem estudada a fim de evitar a fitotoxicidade sobre as plantas. De fato, neste segundo experimento esse efeito foi reduzido, corroborando com Medice et al. (2007) que precisaram reduzir as concentrações de óleo essencial de *Cymbopogon nardus* para evitar os efeitos fitotóxicos em soja. Sabemos a respeito da eficácia fitossanitária de alguns óleos essenciais, e podemos ver pelo estudo realizado por Carnellosi et al. (2009), no qual o óleo de *Cymbopogon citratus* promoveu uma redução significativa sobre o progresso da antracnose em frutos de mamão (doença causada pelo fungo *Colletotrichum gloesporioides*), tratados com 1% deste óleo.

Como tratamento de sementes neste experimento, temos também o produto BISFP, que possui em parte de sua composição extrato de algas. Visto isso, vimos pelo relato do Henrique (2020), que no Brasil, muitos produtos são comercializados contendo algas, e seu uso na agricultura está relacionado com a melhora da estrutura física e das comunidades bacterianas do solo, além do fornecimento de nutrientes entre outras características. Derner (2020) aponta que os extratos de algas, além de conter sais minerais, contém também diversos outros compostos com propriedades bioativas, como hormônios vegetais, aminoácidos, carboidratos e vitaminas. Estes compostos atuam como bioestimulantes nas plantas por meio de alterações fisiológicas, bioquímicas e de expressão de genes (DERNER, 2020).

Carvalho (2014) elucida que a aplicação de extratos de algas pode ser realizada via foliar, pela irrigação, pelo tratamento de sementes ou no solo. É destacado ainda por Carvalho (2014), que o maior aproveitamento ocorre quando estes extratos são aplicados nas sementes ou na fase inicial do desenvolvimento da cultura, promovendo maior desenvolvimento radicular e garantindo melhor resistência a estresses bióticos e abióticos.

Quando se trata a respeito de *Trichoderma* spp., Brotman et al. (2010) observaram que isolados do gênero colonizam a epiderme e as células do córtex de raízes e, conseqüentemente, ativam as vias de sinalização das plantas, desencadeando suas respostas de defesa. Sabemos que o uso do fungo *Trichoderma* spp. é muito promissor, uma vez que este pode interagir diretamente com a planta, promovendo seu crescimento e proporcionando resistência à fitopatógenos (SILVA ET AL., 2019). O gênero *Trichoderma* spp. utiliza diferentes mecanismos sobre os fitopatógenos, sendo o entendimento dos processos biológicos das interações entre planta, patógeno e agente de controle biológico é fundamental para o desenvolvimento e sucesso de estratégias (SILVA ET A., 2019).

Tabela 15: Porcentagem de plântulas normais por tratamento, na primeira contagem (PCG); porcentagem de plântulas normais na segunda contagem (Germinação); porcentagem de plântulas anormais sem sinais do fitopatógeno na segunda contagem; porcentagem de plântulas anormais com sinais do fitopatógeno na segunda contagem; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas sem sinais do fitopatógeno na segunda contagem do teste; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas com sinais do fitopatógeno na segunda contagem do teste, envolvendo o fitopatógeno *C. truncatum*. CTR = *Colletotrichum truncatum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelo; Timo = Timorex Gold; CV = coeficiente de variação.

Tratamento	PCG (%)	Germinação (%)	Plântulas anormais (%)	Plântulas anormais com sinais (%)	Sementes mortas (%)	Sementes mortas com sinais (%)
T1 Água	82 a	92 a	0 e	0 c	4 d	0 c
T2 CTR	23 ef	26 e	56 a	53 a	18,5 ab	17 a
T3 C.C.	30 ef	70 bc	15 c	0 c	15 b	0 c
T4 Tricho	55 bc	81 ab	8 d	0 c	11 bc	0 c
T5 BISFP	66 b	89 a	6 d	0 c	5,5 cd	0 c
T6 CTR x C.C.	23 f	49 d	25 bc	11 b	26 a	6 ab
T7 CTR x Tricho	47 cd	60 cd	23 bc	12 b	18 ab	7 ab
T8 CTR x BISFP	38 de	56 cd	31 b	18 b	13,5 b	4 bc
CV %	6,672	11,01	23,622	89,262	12,978	265,54

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Os parâmetros utilizados nas avaliações foram embasados sobre a qualidade e aspecto das plântulas de soja. Quando a plântula estava sem danos no cotilédone e com crescimento radicular regular, ela foi considerada normal (Figura 17 – A). As plântulas que foram consideradas anormais (Figura 17 – B e C) apresentaram crescimento radicular prejudicado e/ou danos em mais de 50% da superfície dos cotilédones, sendo elas avaliadas perante a presença (C) ou não (B) de sinais do fitopatógeno. As sementes mortas por sua vez, foram aquelas que não apresentaram nenhuma atividade de germinação, estando na maioria dos casos amolecidas (Figura 17 – D e E), estas também foram classificadas entre sementes mortas sem sinais (D) e com sinais (E).



Figura 17: Aspecto das sementes e plântulas constantes da Tabela 15. Plântula normal (A); Plântulas anormais (B e C) e Semente morta (D), do teste realizado com *C. truncatum*. Fotos tiradas após 8 dias do início do experimento.

Na tabela 16, observa-se que a inoculação de *S. sclerotiorum* afetou significativamente a germinação das sementes, sendo que na testemunha sadia (T1), a porcentagem foi de 81% e, na testemunha inoculada (T2) de 11%. Junto do tratamento T2, que apresentou 69% de sementes mortas, os tratamentos T6 (semente inoculada + óleo essencial) e T7 (semente inoculada + Trichodermil sc.) tiveram as porcentagens mais elevadas de sementes mortas, sendo o valor de ambos de 63%.

Com exceção do tratamento 5 (semente sadia + BISFP) que apresentou aumento da porcentagem de germinação, todos os demais tratamentos afetaram, significativamente a germinação das sementes. O tratamento T2, por sua vez, apresentou a maior porcentagem de plântulas anormais (20%), e a menor de germinação (11%), a nível estatístico.

Os tratamentos contendo o fitopatógeno, quando tratados com óleo essencial (T6), com Trichodermil sc. (T7) ou com BISFP (T8) apresentaram menores porcentagens do número de plântulas anormais com sinais e sementes mortas com sinais, em comparação a testemunha inoculada (T2), a nível estatístico. Os dados corroboram com o estudo realizado por Subramanian et al. (2011), onde o extrato da alga *A. nodosum* foi responsável pela indução de resistência sistêmica dependente do ácido jasmônico em *Arabidopsis thaliana* contra *Sclerotinia sclerotiorum*. Calixto (2020) também demonstrou que as leveduras *R. glutinis* e *S. cerevisiae* contribuíram para o aumento de 44,4% e 41,5%, respectivamente, na produtividade de grãos de soja devido à redução da antracnose.

Trichoderma spp. é, sem dúvida, o agente de controle biológico de doenças de plantas mais estudado e utilizado no Brasil e em outros países da América Latina, sendo *Trichoderma harzianum* uma das principais espécies comercializada (BETTIOL ET AL., 2008). No Brasil, a produção e a comercialização de antagonistas como o *Trichoderma* spp. começou por volta dos anos 1990 (POMELLA & RIBEIRO, 2009).

Baker e Snyder (1965) demonstraram a eficiência de *Trichoderma* spp. em controlar fitopatógenos como *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp., que ocasionam tombamento. Visto este e demais estudos, Pomella e Ribeiro (2009) afirmaram, com base nos resultados que estudaram, o potencial do gênero *Trichoderma* spp. como agente de controle biológico para algumas culturas como a soja. Pomella e Ribeiro (2009) também chamam a atenção para o fato de que o uso de *Trichoderma* spp deve ser feito como uma ferramenta de manejo de *S. sclerotiorum*, não sendo considerado como uma solução definitiva.

Tabela 16: Porcentagem de plântulas normais por tratamento, na primeira contagem (PCG); porcentagem de plântulas normais na segunda contagem (Germinação); porcentagem de plântulas anormais sem sinais do fitopatógeno na segunda contagem; porcentagem de plântulas anormais com sinais do fitopatógeno na segunda contagem; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas sem sinais do fitopatógeno na segunda contagem do teste; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas com sinais do fitopatógeno na segunda contagem do teste, envolvendo o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. SSC = *S. sclerotiorum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelô; Timo = Timorex Gold; CV = coeficiente de variação.

	Tratamento	PCG (%)	Germinação (%)	Plântulas anormais (%)	Plântulas anormais com sinais (%)	Sementes mortas (%)	Sementes mortas com sinais (%)
T1	Água	66 a	81 ab	8 bc	0 c	12 cd	0 c
T2	SSC	11 cd	11 e	20 a	16 a	69 a	67 a
T3	C.C.	3 d	33 d	14 abc	0 c	54 ab	0 c
T4	Tricho	57 a	75 b	6 c	0 c	20 c	0 c
T5	BISFP	67 a	88 a	6 c	0 c	6 d	0 c
T6	SSC x C.C.	19 bc	20 de	17 ab	9 ab	63 a	50 ab
T7	SSC x Tricho	25 bc	29 de	6 c	0 c	66 a	40 ab
T8	SSC x BISFP	32 b	53 c	7 c	2 bc	41 b	29 b
	CV %	3,252	12,377	6,799	69,984	17,011	40,622

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Os parâmetros utilizados nas avaliações foram embasados sobre a qualidade e aspecto das plântulas de soja. Quando a plântula estava sem danos no cotilédone e com crescimento radicular regular, ela foi considerada normal (Figura 18 – A). As plântulas que foram consideradas anormais (Figura 18 – B e C) apresentaram crescimento radicular prejudicado e/ou danos em mais de 50% da superfície dos cotilédones, sendo elas avaliadas perante a presença (C) ou não (B) de sinais do fitopatógeno. As sementes mortas por sua vez, foram aquelas que não apresentaram nenhuma atividade de germinação, estando na maioria dos casos amolecidas (Figura 18 – D e E), estas também foram classificadas entre sementes mortas sem sinais (D) e com sinais (E).

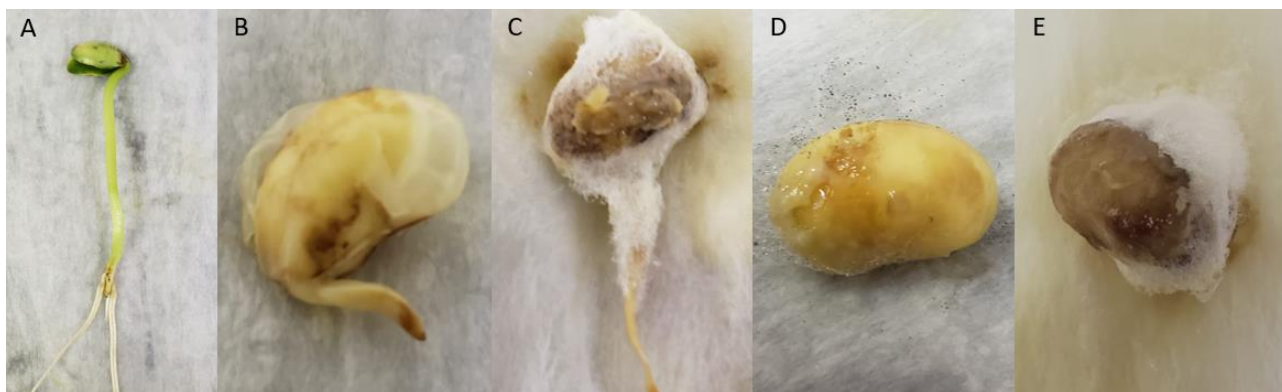


Figura 18: Aspecto das sementes e plântulas constantes da Tabela 15. Plântula normal (A); Plântulas anormais (B e C) e Semente morta (D), do teste realizado com *S. sclerotiorum*. Fotos tiradas após 8 dias do início do experimento.

5.4. Teste de emergência

Para o fitopatógeno *C. truncatum*, conforme ilustrado na tabela 17, estatisticamente todos os tratamentos apresentaram IVE das plântulas semelhantes.

Ainda por esta tabela (17) podemos observar novamente que estatisticamente, todos os tratamentos obtiveram uma porcentagem parecida, ocasionando em um resultado inconclusivo.

Tabela 17: Porcentagem de emergência de plântulas; índice de velocidade de emergência (IVE), por tratamento do teste envolvendo o fitopatógeno *Colletotrichum truncatum*. CTR = *C. truncatum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelo; Timo = Timorex Gold®; CV = coeficiente de variação.

Tratamentos	Emergência (%)	IVE	
T1	Água	23 a	1,77 a
T2	CTR	13 a	1,09 a
T3	C.C.	16 a	1,18 a
T4	Tricho.	39 a	2,85 a
T5	BISFP	36 a	2,79 a
T6	CTR x C.C.	16 a	1,07 a
T7	CTR x Tricho.	21 a	1,60 a
T8	CTR x BISFP	25 a	1,91 a
CV %	36,578	137,17	

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Quando o fitopatógeno em questão foi *S. sclerotiorum*, se pode observar pela tabela 18 que, estatisticamente, os tratamentos que apresentaram o melhor IVE das plântulas foram os que envolviam o produto BISFP, tanto quando as sementes estavam sadias (T5) quanto quando elas

estavam previamente inoculadas com o fitopatógeno (T8). Os demais tratamentos apresentaram um IVE estatisticamente semelhantes, e bem baixos.

Pela tabela 18 também podemos observar que, estatisticamente, o tratamento que apresentou a melhor porcentagem de emergência, novamente envolveu o produto BISFP com sementes sadias (T5), seguido pelo tratamento com o produto e sementes inoculadas (T8) com a segunda melhor porcentagem. As piores porcentagens envolveram os tratamentos de testemunha inoculada (T2) e sementes sadias tratadas com o óleo essencial de Capim-camelô (T3).

É provável que a qualidade fisiológica das sementes foi reduzida devido ao tempo de armazenamento. Como o trabalho inteiro se embasou sobre a mesma variedade e lote, este empecilho era esperado. No entanto, mesmo com uma qualidade fisiológica comprometida, podemos observar que o produto BISFP promoveu um estímulo no desenvolvimento das sementes, indicando ser estimulante de crescimento.

Tabela 18: Porcentagem de plântulas normais por tratamento, na primeira contagem (PCG); porcentagem de plântulas normais na segunda contagem (Germinação); porcentagem de plântulas anormais na segunda contagem; porcentagem de sementes mortas/não-germinadas na segunda contagem do teste envolvendo o fitopatógeno *S. sclerotiorum*. SSC = *S. sclerotiorum*; C.C. = óleo essencial de Capim-camelô; Timo = Timorex Gold®; CV = coeficiente de variação.

Tratamentos		Emergência (%)	IVE
T1	Água	2 bc	0,19 b
T2	SSC	1 c	0,13 b
T3	C.C.	1 c	0,06 b
T4	Tricho.	4 abc	0,44 b
T5	BISFP	39 a	9,12 a
T6	SSC x C.C.	4 bc	0,17 b
T7	SSC x Tricho.	3 abc	0,21 b
T8	SSC x BISFP	28 ab	6,76 a
CV %		746,67	105,74

*Resultados seguidos pela mesma letra não diferem pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade

**CV = coeficiente de variação.

Em um estudo realizado por Silva et al. (2019) foi constatado que o tratamento que envolveu o fungo *Trichoderma harzianum* sobre sementes inoculadas com *S. sclerotiorum* teve um aumento de 22,13% na porcentagem de emergência de plântulas. Em condições de casa de vegetação, Ferreira (2015) relata que a presença de *Trichoderma* sp. em soja, não favoreceu a emergência e o IVE das sementes.

Já Carvalho (2014), ao utilizar extrato da alga *Ascophyllum nodosum* via tratamento de sementes e irrigação aos 30, 60 e 90 dias após a semeadura, observou um aumento no crescimento radicular em plântulas de até 60% em comparação à testemunha. Com este

incremento no crescimento radicular, o estabelecimento da cultura no campo foi otimizado, e a massa seca dos grãos aumentou cerca de 38% (CARVALHO, 2014).

Devido ao efeito bioestimulante em plantas e controle de fitopatógenos, os estudos envolvendo algas marinhas e leveduras tem crescido demasiadamente. Isso se deve principalmente aos grandes benefícios que esses organismos podem trazer como manejo alternativo, sendo considerados bioativos naturais ecologicamente corretos, e uma alternativa ao uso de fertilizantes.

6. CONCLUSÃO

6.1. Experimento 1 - Óleo essencial de *C. schoenanthus* (Capim-camelo), e Timorex Gold®

O óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus*, nas concentrações de 5 µL e 15 µL no teste *in vitro* e de 10% e 20% nos testes *in vivo*, ocasionou redução no crescimento micelial e no desenvolvimento dos fitopatógenos testados. No entanto, conforme foi observado pelos resultados dos testes de germinação e emergência, o óleo essencial de *C. schoenanthus* causou fitotoxicidade na qualidade fisiológica das sementes, uma vez que, na maioria dos experimentos, reduziu os valores, ficando os mesmos próximos a testemunha inoculada apenas com os fitopatógenos.

O Timorex Gold®, nas concentrações de 50 µL no teste *in vitro* e de 10% e 20% nos testes *in vivo*, mostrou ser eficaz na redução do crescimento micelial e no desenvolvimento dos fungos, porém em menor escala que o óleo essencial. O produto não apresentou fitotoxicidade, uma vez que a qualidade fisiológica das sementes não foi prejudicada.

6.2. Experimento 2 - Óleo essencial de *C. schoenanthus* (Capim-camelo), BISFP e Trichodermil sc.®

O produto BISFP aparenta ser eficaz contra o fitopatógeno *C. truncatum*, uma vez que reduziu o crescimento micelial do fungo na concentração de 10 µL no teste *in vitro*. No teste de sanidade com o mesmo produto, também foi observada a redução da incidência deste fitopatógeno nas sementes, no entanto, foi menos eficaz que os demais tratamentos (Óleo essencial e Trichodermil sc.®). O produto BISFP, quando em contato com *S. sclerotiorum*, não apresentou reduções significativas.

Quanto a qualidade fisiológica das sementes, o produto BISFP foi o que apresentou os melhores resultados, uma vez que nos testes *in vivo* exibiu o maior valor significativo de germinação e emergência. Esses resultados indicam uma característica bioestimulante para o BISFP.

Quanto a redução da incidência dos fitopatógenos das sementes constatado pelo teste de sanidade, o produto que exibiu destaque sobre ambos os fitopatógenos, foi o Trichodermil sc.®. O óleo essencial somente apresentou uma redução sobre a incidência do fungo *C. truncatum*.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA SAFRAS. Relatório do USDA faz projeções para a safra 2022/23 de soja no mundo. 2022. Disponível em: < <https://www.canalrural.com.br/projeto-soja-brasil/relatorio-usda-junho-safra-2022-23-soja-mundo/> >, acesso em: 25/04/2022.
- AGRO BAYER BRASIL. ANTRACNOSE (*Colletotrichum truncatum*). Disponível em: < <https://www.agro.bayer.com.br/essenciais-do-campo/alvos-e-culturas/doencas/antracnose> >, acesso em: 15/03/2021.
- AJAYI, O. E.; APPEL, A. G.; FADAMIRO, H. Y. Phytotoxicity of some essential oil components to cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seeds. *International Journal of Plant Biology & Research* 2: 1024, 2014.
- ALMEIDA, F.B.; CERQUEIRA, F.M.; SILVA, R. DO N.; ULHOA, C.J.; LIMA, A.L. Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production. *Biotechnology Letters*, Heidelberg, v. 29, n. 8, p. 1189-93, 2007.
- APROSOJA. A história da soja. Disponível em: <http://www.aprosoja.com.br/sojaemilho/a-historia-da-soja> Acesso em: julho de 2021.
- ARAÚJO, A. N.; COSTA, P. A.; SOUZA, W.; MEDEIROS, J.; SANTOS, S. Atividade antifúngica do óleo essencial de citronela em sementes de Erva-doce (*Foeniculum vulgare* Mill.). *Revista Verde*, Mossoró, v.7, n.1, p. 189–195, 2012.
- ARICI, S. E.; ERDOGAN, O.; TUNCEL, Z. N. Natural, environmental and practical biological control options for fusarium wilt disease of carnation (*Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi). *Applied Ecology and Environmental Research*. 17. 10.15666/aeer/1706_1525515265. 2019.
- ASAD, S. A.; TABASSUM, A.; HAMEED, A.; HASSAN, F. U.; AFZAL, A.; KHAN, S. A.; AHMED, R.; SHAHZAD, M. Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan. *Braz J Microbiol*. 46:1053–1064, 2015.

- BAKER, K. F.; SNYDER, W. C. Ecology of Soil-Borne Pathogens: Prelude to Biological Control. Berkeley, University of California Press. 1965.
- BARBOSA, J.C.; MALDONADO JUNIOR, W. AgroEstat - Sistema para Análises Estatísticas de Ensaaios Agronômicos, Jaboticabal – SP, 2015.
- BARBOSA, MS et al. Atividade biológica in vitro de própolis e óleos essenciais sobre o fungo *Colletotrichum musae* isolado de bananeira (*Musa spp.*). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.17, n.2, p.254-261, 2015.
- BERNARDI, C.; SIEGA, T. C.; REY, M. S. Influência de óleos essenciais no desenvolvimento de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary, agente causal da podridão branca da haste da soja. Summa phytopathologica, v. 45, n. 2, p. 227-228, 2019.
- BETTIOL, W.; GHINI, R.; MORANDI, M. A. B.; STADNIK, M. J.; KRAUS, U.; STEFANOVA, M.; PRADO, A. M. C. Controle biológico de doenças de plantas na América Latina. FEALQ, p. 303-331, 2008.
- POMELLA, A. W. V.; RIBEIRO, R. T. S. Controle biológico com *Trichoderma* em grandes culturas – Uma Visão Empresarial. In: Biocontrole de Doenças de Plantas: Uso e Perspectivas. BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. EMBRAPA. 2009.
- BOSSOU, A.D.; MANGELINCKX, S.; YEDOMONHAN, H.; BOKO, P.; AKOGBETO, M.; DE KIMPE, N.; AVLESSI, F.; SOHOUNHLOUE, D. C. Composição química e atividade inseticida de óleos essenciais de plantas de Benin contra *Anopheles gambiae* (Giles) Vetores de Parasitas, v. 6, p. 337-353, 2013.
- BOSSOU, A. D.; AHOUSSE, E.; RUYBERGH, E.; ADAMS, A.; SMAGGHE, G.; DE KIMPE, N.; AVLESSI, F.; SOHOUNHLOUE, D. C. K.; MANGELINCKX, S. Caracterização de compostos voláteis de três espécies de *Cymbopogon* e *Eucalyptus citriodora* de Benin e suas atividades inseticidas contra *Tribolium castaneum*. Culturas e produtos industriais, v. 76, p 306-317, 2015.
- BOTHA, A. The importance and ecology of yeasts in soil. Soil Biol Biochem, v. 43, p. 1-8, 2011.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Teste de Sanidade de Sementes. In: Regras para Análise de Sementes. Brasília, 1ª ed. Cap.9, p.202-340, 2009a.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Grupos de Patógenos em Relação ao Teste de Sanidade. In: Manual de Análise Sanitária de Sementes, Anexo do Capítulo 9 (Teste de Sanidade de Sementes) das Regras Para Análise de Sementes. Brasília, 1ª ed. p11-22, 2009b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Teste de Germinação. In: Regras para Análise de Sementes. Brasília, 1ª ed., Cap.5, p.147-224, 2009c.
- BROTMAN, Y.; GUPTA, J.K.; VITERBO, A. Trichoderma. *Current Biology*, v.20, p.390-391, 2010.
- BUZZINI, P. E.; MARTINI, A. Biodiversity of killer activity in yeasts isolated from the brazilian rain forest. *Can J Microbiol*, v. 46, p. 607-611, 2000.
- CAI, L.; HYDE, K. D.; TAYLOR, P. W. J.; WEIR, B.; WALLER, J.; ABANG, M. M.; ZHANG, J. Z.; YANG, Y. L.; PHOULIVONG, S.; LIU, Z. Y.; SHIVAS, R. G. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39 (1). pp. 183-204. 2009.
- CALIXTO, G. B. Leveduras no controle de *Colletotrichum truncatum* e seu efeito na Produtividade da soja [Dissertação (Mestrado em Agronomia)]. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2020.
- CAMÓ, C., BONATERRA, A., BADOSA, E., BARÓ, A., MONTESINOS, L., MONTESINOS, E., PLANAS M., FELIU, L. Antimicrobial peptide KSL-W and analogues: Promising agents to control plant diseases. *Peptides*, v. 112, p. 85-95, 2019.
- CARNELOSSI, P. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; ITAKO, A. T.; MESQUINI, R. M. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 11, n. 4, p. 399-406, 2009.

CARSON, C.; MARTELO, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil: A review of antimicrobial and other medicine properties. Clin. Microbiol. Rev. 19, 50–62, 2006.

CARSON, C.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. Mecanismo de ação do óleo de *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) em *Staphylococcus aureus* determinado por tempo de morte, lise, vazamento e ensaios de tolerância ao sal e microscopia eletrônica. Antimicrob. Agents Chemother. 46, 1914–1920, 2002.

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

CARVALHO, J. C. Manejo do cretamento bacteriano comum do feijoeiro por *Rhodotorula Glutinis* e *Sporidiobolus johnsonii* [Mestrado em Agronomia]. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2017.

CARVALHO, M. E. A. Extratos de algas e suas aplicações na agricultura. 58 p. il. 60, 2014.

CARVALHO, R. A.; CHOAIKY, S. A.; LACERDA, J. T.; OLIVEIRA, E. F. Effect of plants with antibiotic properties on the control of *Fusarium* sp. In.: Anais International Plant Protection Congress, vol 2, Jerusalém. Anais Israel: Jerusalém, 1999.

COELHO, A. R.; TACHI, M.; PAGNOCCA, F. C.; NOBREGA, G. M. A.; HOFFMANN, F. L.; HARADA, K. I.; HIROOKA, E. Y. Purification of *Candida quilliermindii* and *Pichia obmeri* killer toxin as na active agente Against *Penicillium expansum*. Food Addit Contam, v. 26, p. 73-81, 2009.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: v.7 Safra 2019/2020 - Décimo levantamento, Brasília, p. 1-69, julho 2020.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira: v.9 Safra 2021/2022 - Décimo levantamento, Brasília, p. 1-88, julho 2022.

- COSTA, P. R.; CUSTÓDIO, C. C.; MACHADO NETO, N. B.; MARUBAYASHI, O. M. Estresse hídrico induzido por manitol em sementes de soja de diferentes tamanhos. *Revista Brasileira de Sementes*, Londrina, v. 26, n. 1, p. 105-113, 2004.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. O modo de ação antimicrobiano do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (óleo da árvore do chá). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170–175, 2000.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. Determinando as ações antimicrobianas do óleo da árvore do chá. *Molecules*. 6, 87–91, 2001.
- DALIO, R. J. D.; MAXIMO, H. J.; ROMA-ALMEIDA, R.; BARRETTA, J. N.; JOSÉ, E. M.; VITTI, A. J.; BLACHINSKY, D.; REUVENI, M.; PASCHOLATI, S. F. Tea Tree Oil Induces Resistência Sistêmica Contra Fusarium Wilt em Banana e Xanthomonas Infection in Tomato Plants. *Plants*, 9, 1137, 2020.
- DARONCO, M. V.; SCHNEIDER, A.; VIAU, L. V. M.; COLET, C. F. Avaliação da Eficácia de Óleos Essenciais no Tratamento de Sementes de Soja. *Ciência Agrícola*, Rio Largo, v. 13, n. 1, p. 49-58, 2015.
- DERNER, R. B. As algas na agricultura. *Aquaculture Brasil*. Disponível em: <<https://www.aquaculturebrasil.com/coluna/115/as-algas-na-agricultura>> 2020.
- DIAS, M. D.; PINHEIRO, V. F.; CAFÉ-FILHO, A. C. Impact of anthracnose on the yield of soybean subjected to chemical control in the north region of Brazil. *Summa Phytopathologica*, v. 42, n. 1, p. 18-23, 2016.
- DI STASI, L. C. Química de produtos naturais: principais constituintes ativos. In: Di Stasi, L.C. (Ed.). *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudos multidisciplinar*. São Paulo: Universidade Paulista, p.109-127, 1996.
- EL MEHALAWY, A. A. The rhizosphere yeast fungi as biocontrol agentes for wilt disease os kidney bean caused for *Fusarium oxysporum*. *Int J Agric Biol*, v. 6, p. 310-316, 2004.

- EL TARABILY, E.; SIVASITHAMPARAM, K. Potencial os yeast as biocontrol agentes os soil-born fungal plant pathogens and plant growth promoters, *Mycoscience*, v. 47, p. 25-35, 2006.
- FERREIRA, T.C. Níveis de inóculo de *Sclerotinia sclerotiorum* em relação à desempenho de sementes de soja tratadas com fungicidas e agentes biológicos. 68f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- FRANZENER, G.; STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S. Atividade antifúngica e indução de resistência em trigo a *Bipolaris sorokiniana* por *Artemisia camphorata*. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.25, n.2, p.503-507, 2003.
- GHAZANFAR, M. U.; RAZA, M.; RAZA, W.; QAMAR, M. I. Trichoderma as potential biocontrol agent, its exploitation in agriculture: a review. *Plant Protection*, v. 2, n. 3, p. 109-135, 2018.
- GIEPEN, M.; NETO, F. S.; KOPKE, U. Herbicidas Naturais com Potencial para Uso em Agricultura Orgânica. In: OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Controle de Plantas Daninhas: Métodos físico, mecânico, cultural, biológico e aleopatia. Embrapa, p. 82-87, 2018.
- GODOY, C.V.; ALMEIDA, A.M.R.; COSTAMILAN, L.M.; MEYER, M.; DIAS, W.P.; SEIXAS, C.D.S.; SOARES, R.M.; HENNING, A.A.; YORINORI, J.T.; FERREIRA, L.P.; SILVA, J.F.V.; Doenças da soja. In: AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Org.). Manual de Fitopatologia: v. 2. Doenças das plantas cultivadas. 5. ed. São Paulo: Ceres, p. 657- 675, 2016.
- GOULART, A.C.P. Detecção e Controle Químico de *Colletotrichum* sp. em Sementes de Soja e Algodão. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste. 33 p. 2009.
- GOULART, A. C. P. Fungos em sementes de soja: detecção, importância e controle. Embrapa Agropecuária Oeste. 2 ed., 2018.
- HENRIQUE, F. Algas marinhas e o seu uso na agricultura moderna. Disponível em: <<https://amazonagrosciences.com.br/algas-marinhas-e-agricultura-moderna/>> 2020.

- HILLEN, T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; MESQUINI, R. M.; CRUZ, M. E. S.; STANGARLIN, J. R.; NOZAKI, M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais no controle de alguns fitopatógenos fúngicos *in vitro* e no tratamento de sementes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 14 n. 3, 2012.
- HIRAKURI, M.H.; LAZZAROTTO, J.J. O agronegócio da soja nos contextos mundial e brasileiro. Documentos, 349. Londrina, 2014.
- ISMAN, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19, 603-608, 2000.
- ITAKO, A. T.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA CRUZ, M. E. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 76, n. 1, p. 75-83, 2009.
- KATIKI, L. M.; CHAGAS, A. C. S.; BIZZO, H. R.; FERREIRA, J. F. S.; AMARANTE, A. F. T. Atividade anti-helmíntica dos óleos essenciais *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* e *Mentha piperita* avaliados em quatro diferentes testes *In Vitro*. *Vetores de Parasitas*, 183, p. 103–108, 2011.
- KOCH, E. F. A.; FRIGO, P.; MORAES, M. H. D. Inoculação de Sementes de Fumo Bravo (*Solanum granuloseprosum*) e fedegão (*Senna alata*) com *Fusarium* sp. sob diferentes períodos de contato. In: XX Congresso Brasileiro de Sementes, 2017, Foz do Iguaçu. Informativo ABRATES. Londrina: ABRATES, v. 27, 2017.
- KUMAR, K., AMARESAN, N., BHAGAT, S.& MADHURI, K. Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens. *Indian Journal of Microbiology*, India-IN, 52, 2, p. 137- 144, 2012.
- LAZZAROTTO, J. J.; HIRAKURI, M. H. Evolução e perspectivas de desempenho econômico associadas com a produção de soja nos contextos mundial e brasileiro. Documentos, 319. Londrina, 2010.

- LOUZADA, G. A. S.; CARVALHO, D. D. C.; MELLO, S. C. M.; LOBO JÚNIOR, M.; MARTINS, I.; BRAÚNA, L. M. Potencial antagonico de *Trichoderma* spp. originários de diferentes agroecossistemas contra *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium solani*. *Biota Neotropica*, 9(3): 145-149, 2009.
- LUIZ, C.; ROCHA NETO, A. C.; FRANCO, P. O.; DI PEIRO, R. M. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. *Trop. Plant Pathol.* 3, 1–12. <http://doi.org/10.1007/s40858-017-0153-5>, 2017.
- LYON, G. D.; REGLINSKI, T.; NEWTON, A. C. Novel disease control compounds: the potential to “immunize” plants Against infection. *Plant Pathology*, v.44, p. 407-427, 1995.
- MACHADO, M. A. C. F.; BETTIOL, W. Potencial para o biocontrole de *Botrytis cinerea* por leveduras em sistema integrado de cultivo de lírio. 45(6), p. 539–545, 2010.
- MAGALHÃES, H. M.; AQUINO, C. F.; SOARES, E. P. S.; SANTOS, L. D. T. S.; LOPES, P. S. N. Allelopathic action essential oils of alecrim-pimenta and lemongrass in germination of lettuce achenes. *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 34, n. 2, p. 485-496, 2013.
- MAGUIRE, J. D. Speed germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci., Madison*, v. 2, p.176-177, 1962.
- MANANDHAR, J. B.; HARTMAN, G. L. Anthracnose. In: Hartman GL, Sinclair JB, Rupe JC (Eds.) *Compendium of soybean diseases*. 4. ed. Saint Paul MN. APS Press. pp. 13-14, 1999.
- MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Fichas Agroecológicas. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/sustentabilidade/organicos/fichas-agroecologicas>. Acesso em: 21/09/2020.
- MARIANO, D. C.; GIEBELMEIER, C. G.; ALBUQUERQUE, G. D. P.; DA SILVA, C. R.; OKUMURA, R. S. Uso de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* no tratamento de sementes de girassol. *Enciclopédia Biosfera*, v. 10, n. 18, p. 2961-2971, 2014.

- MARINELLI, E et al. Activity of Some Essential Oils against Pathogenic Seed Borne Fungi on Legumes. *Asian Journal of Plant Pathology*, v. 6, p. 66-74, 2012.
- MARTINS, J.A.S.; SAGATA, É.; SANTOS, V.A.; JULIATTI, F.C. Avaliação do efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. *Bioscience Journal*, Uberlândia, v. 27, n. 1, p. 49-51, 2010.
- MATOS, F. J. A. As plantas da farmácia viva. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, v.1, 57p, 1997.
- MEDEIROS, F. H. V.; DA SILVA, J. C. P.; PASCHOLATI, S. F. Controle biológico de doenças de plantas. In: Amorim L, Rezende JAM, Bergamin Filho A (eds) *Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos*, 5th ed. Editora Agronômica Ceres Ltda, p.261-274, 2018.
- MEDICE, R.; ALVES, E.; ASSIS, R. T.; MAGNO-JUNIOR, R. G.; LOPES, H. A. G. L. Óleos essenciais no controle da ferrugem asiática da soja *Phakopsora pachyrhizi* Syd. & P. Syd. *Ciência e Agrotecnologia* 31: 83-90. 2007.
- MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; LOBO JUNIOR, M. Avaliação à campo de *Trichoderma* em mofo-branco. In: MEYER, M. C.; MAZARO, S. M.; SILVA, J. C. (Ed.), *Trichoderma: uso na agricultura*. Brasília, DF: Embrapa, p. 339-346, 2019.
- MIETH, A.; PIVETA, G.; PACHECO, C.; HAMANN, F. A.; RODRIGUES, J.; MUNIZ, M. F. B.; BLUME, E. Microflora e qualidade fisiológica de sementes de cedro (*Cedrella fissilis*) tratadas com extrato natural de hortelã (*Mentha piperita*). *Revista Brasileira de Agroecologia*, p. 29-33, 2007.
- MORAIS, L. A. S.; RAMOS, N. P.; GONÇALVES, G. G.; BETTIOL, W.; CHAVES, F. C. M. Atividade antifúngica de óleos essenciais em sementes de feijão cv. Carioquinha. *Horticultura Brasileira*, 26, (2), 6261- 6266, 2008a.
- MORAIS, L. A. S.; RAMOS, N.; BETTIOL, W.; CHAVES, F. C. M. Efeito de óleos essenciais na germinação e sanidade de sementes de soja. In: congresso brasileiro de olericultura, *Horticultura Brasileira*, 1, p. 17-21, 2008b.

- MUKHERJEE, S.; SEN, S. K. Exploration of novel rhizospheric yeast isolate as fertilizing soil inoculant for improvement of maize cultivation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(7), p. 1491–1499, 2015.
- NAKAGAWA, J. Testes de vigor baseados no desempenho de plântulas. In: KRZYZANOWSKI, F.C.; VIEIRA, R.D.; FRANÇA NETO, J.B. (Ed.). *Vigor de sementes: conceitos e testes*. Londrina: ABRATES, cap.2, p.1-24, 1999.
- NASCIMENTO, D. M.; RIBEIRO-JUNIOR, M. R.; SANTOS, P. L.; PEREIRA, A. E.; KRONKA, A. Z. Óleos essenciais no tratamento de sementes. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, v. 27, p. 77-90, 2021.
- OLINTO, F. A.; NUNES, M. S.; DA SILVA, L. G.; DA SILVA, H. F.; NASCIMENTO, L. C. Óleos essenciais sobre a qualidade de sementes de leucena. *Revista Principia* n° 54, p. 9-19, 2021.
- OZENDA, P. *Flora e vegetação do Saara*. 3ª ed. CNRS, Paris, 1991.
- PASCHOLATI, S.F. Potencial de *Saccharomyces cerevisiae* e outros agentes bióticos na proteção de plantas contra patógenos. Piracicaba, 1998. 123 p. Tese (Livre-Docência) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- PAWLOWSKI, A.; KUZEY, C. A.; BASTOS, K. P.; BIRCK, T. P.; DA SILVA, E. R. Potencial alelopático dos óleos essenciais de capim-limão, citronela e lavanda. *Agroecologia: métodos e técnicas para uma agricultura sustentável - Volume 4*, cap 11, p. 142-152, 2021.
- PELTIER, H.; DABIN, W.; DANIEL, P.; VAN CANNEYT, O.; DORÉMUS, G.; HUON, M.; RIDOUX, V. The significance of stranding data as indicators of cetacean populations at sea: Modelling the drift of cetacean carcasses. *Ecol. Indic.* 18, 278-290, 2012.
- PEREIRA, R. B.; LUCAS, G. C.; PERINA, F. J.; RESENDE, M. L. V.; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, v. 35, n. 1, p. 115-123, 2011.

- QUEIROZ, T. N.; PASCUALI, L. C.; SILVA, A. C. P.; PORTO, A. G.; CARVALHO, J. W. P. Extratos e óleos essenciais como alternativa no controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *sclerotium rolfsii* isolados de soja (*Glycine max* L.), 2020.
- QUEIROZ, V. T.; AZEVEDO, M. M.; DA SILVA QUADROS, I. P.; COSTA, A. V.; DO AMARAL, A. A.; JUVANHOL, R. S.; DOS SANTOS, A. R. Environmental risk assessment for sustainable pesticide use in coffee production. *Journal of contaminant hydrology*, v. 219, p. 18-27, 2018.
- REINO, J.L.; GUERRERO, R.F.; HERNÁNDEZ-GALÁN R.; COLLADO, I.G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. *Phytochemistry Reviews*, New York, v. 7, p. 89–123, 2008.
- REIS, E. M.; ZANATTA, M.; REIS, A. C. Mofa- branco da soja. Passo Fundo: Berthier. p.96, 2019.
- REUVENI, M.; BARBIER, M.; VITI, A. J. Óleo essencial da árvore do chá como ferramenta para combater a Sigatoka negra na banana. *Outlooks Pest Manag.* 2020.
- REZENDE, A. A. Eficiência de diferentes produtos comerciais à base de *Trichoderma* spp. No controle da podridão branca da haste da soja [Dissertação (Mestrado em Agronomia)]. Universidade Federal de Uberlândia, 2011.
- SANTOS, P. L. Manejo de *Macrophomina phaseolina* (tassi) goid. em sementes de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* l.) com óleos essenciais e antagonistas. Tese, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Botucatu, SP, Brasil, 2018.
- SARMENTO-BRUM, R. B. C.; CASTRO, H. G.; SILVA, M. L.; SARMENTO, R. A.; NASCIMENTO, I. R.; SANTOS, G. R. Efeito de óleos vegetais na inibição do crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. V. 6, n. 1, p. 63-70, fev. 2014.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. *Revista Floresta*, Curitiba, v.30, p.129-137, 2000.

SCHNEIDER, R. L.; MÜHLMANN, H.; TOMMASI, E.; MEDEIROS, R. A.; DAEMON, R. F.; NOGUEIRA, A. A. Revisão estratigráfica da Bacia do Paraná. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOLOGIA, 28., 1974, Porto Alegre. Anais do... São Paulo: Sociedade Brasileira de Geologia, v. 1, p. 41-65, 1974.

SENEME, A. M.; SILVA, F. C.; RUARO, L.; FERRIANI, A. P.; MORAES, C. P. N. Controle de patógenos em sementes de sorgo com óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (D. C.), 16(2), 433 – 440, 2019.

SHAO, X.; CHENG, S.; WANG, H.; Y. U. D.; MUNGAI, C. O possível mecanismo de ação antifúngica do óleo da árvore do chá em *Botrytis cinerea*. J. Appl. Microbiol. 114, 1642–1649, 2013.

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

SILVA, M.R.; MOURA, E.A.; MOURA, L.S.; CHAGAS, P.C.; CHAGAS, E.A. 2014. índice de velocidade e porcentagem de emergência em sementes de maracujazeiro amarelo em diferentes substratos. XXIII Congresso Brasileiro de Fruticultura, Cuiabá – MT, 2014.

SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; STEINDORFF, A. S.; GOMES, E. V.; NORONHA, E. F.; ULHOA, C. J. Trichoderma/pathogen/plant interaction in pre-harvest food security. Fungal Biol, 123(8), 565-583, 2019.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. Revista de Biologia e Ciência da Terra, João Pessoa, v.5, n.1, 2005.

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

- SOUZA, P. F.; SILVA, G. H.; HENRIQUES, I. G. N., CAMPELO, G. J; ALVES, G. S. Atividade antifúngica de diferentes concentrações de extrato de alho em sementes de ingá (*Inga edulis*). *Revista Verde*, 5, 5, p. 8–13, 2010.
- STANGARLIN, J. R.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, Brasília, v.2, n.11, p.16-21, 1999.
- STEFFEN, G. P. K.; MALDANER, J.; STEFFEN, R. B.; MISSIO, E. L.; MEZZOMO, R. Controle de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium* sp. com óleo essencial de Melaleuca. *Enciclopédia Biosfera*, v. 16, n° 30, p. 682-694, 2019.
- SUBRAMANIAN, S.; SANGHA, J. S.; GRAY, B. A.; SINGH, R. P.; HILTZ, D.; CRITCHLEY, A. T.; PRITHIVIRAJ, B. Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. *European Journal of Plant Pathology*, 131(2), p. 237–248, 2011.
- TEIXEIRA, G. A.; ALVES, E.; AMARAL, D. C.; MACHADO, J. C.; PERINA, F. J. Essential oils on the control of stem and ear rot in maize. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 43, n. 11, p. 1945-1951, nov. 2013.
- ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44(11), p. 1499–1503, 2009.