

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar



Tese

**Aplicação do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Chinchilho)
no tratamento de sementes de feijão**

Gabriela Berguenmaier de Olanda

Pelotas, 2018.

Gabriela Berguenmaier de Olanda

**Aplicação do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Chinchilho)
no tratamento de sementes de feijão**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção de título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Dr. Gustavo Schiedeck
Co-Orientador: Prof. Dr. Carlos Rogério Mauch
Co-Orientador: Dr. José Ernani Schewengber
Co-Orientador: Dra. Patrícia Braga Lovatto

Pelotas, 2018.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

O42a Olanda, Gabriela Berguenmaier de

Aplicação do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Chinchilho) no tratamento de sementes de feijão / Gabriela Berguenmaier de Olanda ; Gustavo Schiedeck, orientador. — Pelotas, 2018.

115 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Fumigação. 2. *Macrophomina phaseolina*. 3. *Phaseolus vulgaris*. 4. *Sclerotinia sclerotiorum*. 5. Volatilização. I. Schiedeck, Gustavo, orient. II. Título.

CDD : 635.652

Gabriela Berguenmaier de Olanda

Aplicação do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Chinchilho)
no tratamento de sementes de feijão

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 31 de agosto de 2018.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Schiedeck (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Carlos Eduardo da Silva Pedroso
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Eduardo Guatimosim
Doutor em Fitopatologia pela Universidade Federal de Viçosa.

Prof. Dr. Gilberto Antônio Peripolli Bevilaqua
Doutor em Ciência e Tecnologia de Sementes pela Universidade Federal de Pelotas.

A minha filha Manoela, com todo meu amor, **dedico**.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a vida, por me proporcionar a convivência e a troca de experiência com pessoas e realidades diferentes, que ao longo da minha jornada têm oportunizado-me ser uma pessoa a cada dia melhor.

Ao nônio José, pelo amor de pai e pela força de viver, a mãe Inês (*In memoriam*), por todo amor dado e por estar sempre presente em meus pensamentos, aos tios, tias, primos e primas, pelos momentos de carinho e incentivo.

Aos meus pais, Rosemeri e João, tão amados, pelo amor, presença e preocupação, mas também por nunca deixarem de acreditar em mim.

Ao meu irmão Gustavo, pelo carinho e por ser um tio tão amável.

À minha pequena grande Manoela, filhota amada, que todos os dias me fortalece e me faz acreditar que o mundo pode ser cada dia mais feliz.

Ao meu companheiro Ricardo, pelo pai maravilhoso que é, pela paciência ao longo dessa jornada e carinho em todas as horas.

Aos amigos e colegas da UFPel e da Embrapa Clima Temperado Estação Experimental Cascata. Em especial a Calisc, Régis, Volnei, Amanda, Cristine, Fabiane, Louise, Willian, Yasmim, Daniela, Camila, Gabriela, Daniel, Maurício, Rafaela e Priscila pela amizade, convivência e troca de experiências.

Ao meu orientador e professor Gustavo Schiedeck pela amizade, por acreditar no meu trabalho e mostrar-se diligente na construção desta tese.

Aos meus co-orientadores Carlos Rogério Mauch, José Ernani Schewengber e Patrícia Braga Lovatto pela amizade e orientação.

À Capes pela bolsa de estudos concedida.

Resumo

OLANDA, Gabriela Berguenmaier de. **Aplicação do óleo essencial de *Tagetes minuta* (Chinchilho) no tratamento de sementes de feijão**. 2018. 115f. Doutorado (Doutorado em Agronomia). – Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2018.

O objetivo do trabalho foi avaliar a ação volátil do óleo essencial de *T. minuta* sobre *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, in vitro, e no tratamento de sementes de feijão, bem como seu efeito na qualidade fisiológica das sementes. Foram realizados 3 experimentos em laboratório. No primeiro, os fitopatógenos foram expostos a diferentes volumes do óleo essencial, in vitro. Para *S. sclerotiorum* foram utilizados os volumes de 2, 5, 10, 15 e 20 μ L e para *M. phaseolina* 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75 μ L de óleo essencial. Com base nos resultados, foram testadas ainda in vitro, combinações entre volumes de óleo essencial e tempos de exposição, os quais foram de 10, 15, 20 e 25 μ L para *S. sclerotiorum* e 75, 80, 85, 90, 95 e 100 μ L para *M. phaseolina*, por períodos de exposição de 24, 48, 72 e 96h. Nesses dois primeiros ensaios, os resultados foram apresentados em taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), sendo que para *S. sclerotiorum*, no segundo ensaio, também em taxa de número de escleródios (TNE) e taxa de massa de escleródios (TME). O terceiro experimento, que usou como base os resultados das etapas anteriores, consistiu no tratamento de sementes via volatilização, com sementes inoculadas e não inoculadas com os fungos. Para *S. sclerotiorum* foram usados 150, 300, 600 e 1200 μ L de óleo essencial e para *M. phaseolina* 600, 1200, 2400 e 4800 μ L, com 24h de exposição. As sementes tratadas foram semeadas em substrato e, após 21 dias para *S. sclerotiorum* e 15 dias para *M. phaseolina*, foram avaliados o comprimento de parte aérea (CPA) e raiz (CR), a massa seca de parte aérea (MSPA) e raiz (MSR), a taxa de índice de doença (TID) e taxa de incidência de doença (TIN). Em todas as etapas foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com 6 repetições. A análise estatística foi realizada por modelos lineares generalizados (GLM) com distribuição Beta e análise de componentes principais. A exposição dos fitopatógenos aos voláteis do óleo essencial resultou no aumento na TIC em ambos os fungos e diminuição da TNE e TME de *S. sclerotiorum*, apresentando um comportamento volume-dependente e tempo-dependente. Sobre as plântulas de feijão, se verificou redução da TID e TIN causadas por ambos os patógenos, mostrando um comportamento volume-dependente. As menores TID e TIN foram obtidas com 1200 μ L do óleo essencial para *S. sclerotiorum* e com 4800 μ L para *M. phaseolina*, em ambos os casos com 24h de exposição. O volume de óleo essencial eficiente para o controle dos fungos teve baixa correlação negativa com as variáveis de crescimento das plantas de feijão. As plântulas da cultivare BRS Expedito e Carioca demonstraram comportamentos diferenciados em resposta à interação existente entre patógeno e óleo essencial de *T. minuta*. O tratamento de sementes de feijão com o uso de voláteis do óleo essencial de *T. minuta* se mostrou uma estratégia promissora para a produção de sementes agroecológica e necessita novos estudos para aprimorar a técnica de utilização em maior escala.

Palavras-chave: Fumigação; *Macrophomina phaseolina*; *Phaseolus vulgaris*; *Sclerotinia sclerotiorum*; Volatilização.

Abstract

OLANDA, Gabriela Berguenmaier de. **Application of the essential oil of *Tagetes minuta* (Chinchilla) in the treatment of bean seeds.** 2018. 115f. Doctoral Thesis Graduate Program in Family Agricultural Production Systems. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

The objective of this work was to evaluate the volatile action of *T. minuta* essential oil on *S. sclerotiorum* and *M. phaseolina*, in vitro, and on the treatment of bean seeds, as well as its effect on the physiological quality of the seeds. Three experiments were carried out in the laboratory. In the first, phytopathogens were exposed to different volumes of the essential oil, in vitro. For *S. sclerotiorum* the volumes of 2, 5, 10, 15 and 20 μ L and for *M. phaseolina* 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 and 75 μ L of essential oil were used. Based on the results, they were further tested in vitro, combinations of essential oil volumes and exposure times, which were 10, 15, 20 and 25 μ L for *S. sclerotiorum* and 75, 80, 85, 90, 95 and 100 μ L for *M. phaseolina*, for exposure periods of 24, 48, 72 and 96h. In the first two trials, the results were presented in mycelial growth inhibition rate (GIR), and for *S. sclerotiorum*, in the second trial, also in sclerode number rate (SNR) and sclerode smear mass rate (SSMR). The third experiment, which used as a basis the results of the previous stages, consisted in the treatment of seeds via volatilization, with seeds inoculated and not inoculated with fungi. For *S. sclerotiorum* 150, 300, 600 and 1200 μ L of essential oil were used and for *M. phaseolina* 600, 1200, 2400 and 4800 μ L, with 24h exposure. The treated seeds were sown on substrate and, after 21 days for *S. sclerotiorum* and 15 days for *M. phaseolina*, the length of aerial part (LAP) and root (LR), the dry mass of aerial part (DMAP) and root (DMR), disease index rate (DIR) and disease incidence rate (INR). In all stages, the design was completely randomized with 6 replicates. The statistical analysis was performed by generalized linear models (GLM) with Beta distribution and principal components analysis. The exposure of phytopathogens to essential oil volatiles resulted in an increase in GIR in both fungi and a decrease in SNR and SSMR of *S. sclerotiorum*, presenting a volume-dependent and time-dependent behavior. On the bean seedlings, there was a reduction of DIR and INR caused by both pathogens, showing a volume-dependent behavior. The lowest DIR and INR were obtained with 1200 μ L of the essential oil for *S. sclerotiorum* and 4800 μ L for *M. phaseolina*, in both cases with 24h exposure. The volume of essential oil efficient for fungi control had low negative correlation with the bean plant growth variables. The seedlings of the cultivar BRS Exedito and Carioca demonstrated differentiated behaviors in response to the interaction between pathogen and essential oil of *T. minuta*. The treatment of bean seeds with the use of volatile of the essential oil of *T. minuta* has shown to be a promising strategy for agroecological seed production and requires new studies to improve the technique of use on a larger scale.

Key words: Fumigation; *Macrophomina phaseolina*; *Phaseolus vulgaris*; *Sclerotinia sclerotiorum*; Volatilization.

Lista de Figuras

Figura 1	Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC) sobre <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> [A] (n=5) e sobre <i>Macrophomina phaseolina</i> [B] (n=12) após 72 horas de exposição aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial (OE) de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018....	46
Figura 2	Qualidade do ajuste da equação de regressão para a taxa de inibição do crescimento de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> e em diferentes tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	53
Figura 3	Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), pelo volume de óleo essencial [A] (n=5) e pelo tempo de exposição [B](n=5), de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetida aos voláteis de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	54
Figura 4	Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), pelos volumes de 10, 15, 20 e 25µL óleo essencial [A] (n=5) e pelos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h [B](n=5), de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetida aos voláteis de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	56

Figura 5	Qualidade do ajuste das equações de regressão para a taxa de número de escleródios (A) e para a taxa de massa de escleródios (B) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> e em diferentes tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	58
Figura 6	Relação volume-resposta para a taxa de número de escleródios (TNE), pelo volume de óleo essencial [A] (n=5) e pelo tempo de exposição [B] (n=5), e para a taxa de massa de escleródios (TME), pelo volume de óleo essencial [C] (n=5) e pelo tempo de exposição [D] (n=5), de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetida aos voláteis de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	60
Figura 7	Relação volume-resposta para a taxa de inibição de número de escleródios, pelos volumes de 10, 15, 20 e 25µL de óleo essencial [A] (n=5) e pelos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h [B] (n=5), e para a taxa de inibição da massa de escleródios, pelos volumes de 10, 15, 20 e 25µL de óleo essencial [C] (n=5) e pelos tempos de exposição 24, 48, 72 e 96h [D] (n=5), de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetida aos voláteis de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018....	64
Figura 8	Qualidade do ajuste da equação de regressão para a taxa de inibição do crescimento de <i>Macrophomina phaseolina</i> submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> e em diferentes tempos de exposição (n=150). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	66

Figura 9	Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), pelo volume de óleo essencial [A] (n=7) e pelo tempo de exposição [B] (n=5), de <i>Macrophomina phaseolina</i> submetida aos voláteis de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	68
Figura 10	Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial, pelos volumes de 75, 80, 85, 90, 95 e 100µL de óleo essencial [A] (n=5) e pelos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h [B](n=5), de <i>Macrophomina phaseolina</i> submetida aos voláteis de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	70
Figura 11	Análise componentes principais (CP) de variáveis de crescimento e fitossanitárias de sementes de feijão cv. BRS Expedito (a) e Carioca (b) infectadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . CPA, comprimento de parte aérea; CR, comprimento de raiz; MSPA, massa seca de parte aérea; MSR, massa seca de raiz; INC, incidência de doença; ID, índice de doença. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	74
Figura 12	Relação volume-resposta para a taxa de incidência de doença (TIN) e a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito [A] e Carioca [B] infectadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018....	78

Figura 13	<p>Análise componentes principais (CP) de variáveis de crescimento e fitossanitárias de sementes de feijão cv. BRS Expedito (a) e Carioca (b) infectadas com <i>Macrophomina phaseolina</i> submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i>. CPA, comprimento de parte aérea; CR, comprimento de raiz; MSPA, massa seca de parte aérea; MSR, massa seca de raiz; INC, incidência de doença; ID, índice de doença. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....</p>	83
Figura 14	<p>Relação volume-resposta para a taxa de incidência de doença (TIN) e a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito [A] e Carioca [B] infectadas com <i>Macrophomina phaseolina</i> submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i>. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....</p>	85

Lista de Tabelas

Tabela 1	Análise da composição química do óleo essencial de plantas de <i>Tagetes minuta</i> , em plena floração, coletadas no Município de Piratini-RS/Brasil (31°31'40,7" S 52°25'31,8" W) no dia 12 de maio de 2015. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	36
Tabela 2	Escala para avaliação da intensidade de <i>Macrophomina phaseolina</i> em feijão. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	43
Tabela 3	Escala para avaliação da intensidade de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> em feijão. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	43
Tabela 4	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta baseados na distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial (TIC) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (n=5) e <i>Macrophomina phaseolina</i> (n=12) após 72 horas de exposição aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> . Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018....	46
Tabela 5	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> e tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	51

Tabela 6	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial (TIC) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , obtidos a partir dos valores médios observados e de forma separada para o volume de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> (n=5) e tempo de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	54
Tabela 7	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , obtidos a partir dos valores médios observados para os diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> (n=5) e tempos de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	56
Tabela 8	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa do número de escleródios (TNE) e para a taxa da massa de escleródios (TME) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> e tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018....	58
Tabela 9	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de número de escleródios (TNE) e a taxa de massa de escleródios (TME) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , obtidos a partir dos valores médios observados e de forma separada para o volume de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> (n=5) e tempo de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	59

Tabela 10	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de número de escleródios (TIN) e taxa de massa de escleródios (TIM) de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , obtidos a partir dos valores médios observados para os diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> (n=5) e tempos de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	62
Tabela 11	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> e tempos de exposição (n=150). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	66
Tabela 12	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , obtidos a partir dos valores médios observados e de forma separada para o volume de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> (n=5) e tempo de exposição (n=7). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....	68
Tabela 13	Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de <i>Macrophomina phaseolina</i> , obtidos a partir dos valores médios observados para os diferentes volumes de óleo essencial de <i>Tagetes minuta</i> (n=5) e tempos de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018....	70

Tabela 14	<p>Parâmetros estatísticos das curvas de regressão utilizando a distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de incidência de doença (TIN) e para a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito e Carioca infectadas com <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial (OE) de <i>Tagetes minuta</i>. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....</p>	76
Tabela 15	<p>Parâmetros estatísticos das curvas de regressão utilizando a distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de incidência de doença (TIN) e para a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito e Carioca infectadas com <i>Macrophomina phaseolina</i> submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial (OE) de <i>Tagetes minuta</i>. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.....</p>	85

Sumário

1	Introdução	18
2	Revisão da Literatura	21
2.1	Aspectos sobre o feijão	21
2.2	Doenças associadas a sementes de feijão.....	22
2.2.1	Mofo branco no feijão.....	23
2.2.2	Podridão cinzenta do caule.....	26
2.3	Óleos essenciais: características gerais e aplicações.....	27
2.3.1	Tratamento de sementes com óleos essenciais	28
2.3.2	Efeito dos óleos essenciais na qualidade fisiológica das sementes ..	31
2.4	<i>Tagetes minuta</i> L.	32
3	Material e métodos	34
3.1	Local e período de realização do trabalho	34
3.2	Óleo essencial de <i>T. minuta</i>	34
3.3	Obtenção de isolados fúngicos.....	37
3.4	Ensaio experimental 1	37
3.5	Ensaio experimental 2	38
3.6	Ensaio experimental 3	39
3.6.1	Sementes de feijão.....	39
3.6.2	Inoculação de sementes com os fitopatógenos.....	39
3.6.3	Tratamento de sementes	40
3.6.4	Sistematização do experimento.....	41
3.6.5	Avaliações realizadas	41
3.6.5.1	Comprimento de parte aérea e raiz	41
3.6.5.2	Massa seca de parte aérea e raiz.....	41
3.6.5.3	Incidência de doença	42
3.6.5.4	Severidade de doença	42
3.7	Procedimento experimental e análise estatística.....	44
4	Resultados e discussão	45
4.1	Avaliação do efeito biológico de voláteis de óleo essencial de <i>T. minuta</i> sobre <i>S. sclerotiorum</i> e <i>M. phaseolina</i>	45
4.2	Relação volume-resposta do crescimento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> e <i>M. phaseolina</i> em função do tempo de exposição e volume de óleo essencial de <i>T. minuta</i>	49

4.3	Efeito de voláteis de óleo essencial de <i>T. minuta</i> sobre patógenos de sementes	73
4.3.1	Sementes de feijão inoculadas com <i>S. sclerotiorum</i>	73
4.3.2	Sementes de feijão inoculadas com <i>M. phaseolina</i>.....	82
5	Conclusão	90
	Referências.....	92
	Anexos	107

1 Introdução

O uso de agrotóxicos químicos sintéticos, no Brasil, vem crescendo de modo alarmante nos últimos anos, pois tais produtos são considerados extremamente relevantes para o modelo de agricultura apregoado para a produção extensiva de commodities. Provocando, desde a década de 60, drásticas mudanças sobre a agricultura tradicional do país, além de danos ao meio ambiente e ao homem (LONDRES, 2011).

As altas taxas de resíduos de agrotóxicos químicos sintéticos encontrados em alimentos (ANVISA, 2016), vêm desencadeando uma demanda por alimentos orgânicos, produzidos dentro de um contexto social e ambiental mais favorável, impulsionando a produção agroecológica.

Ademais, a agricultura familiar vem ganhando força com o avanço dos debates sobre desenvolvimento sustentável, soberania alimentar e desenvolvimento local, tanto que 2014 foi escolhido pela FAO como o Ano Internacional da Agricultura Familiar (FAO, 2014). Programas governamentais como o PAA (Programa de Aquisição de Alimentos) e PNAE (Programa Nacional de Alimentação Escolar) e mais recentemente com a PNAPO (Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica) têm alavancado a produção agroecológica, garantindo maior remuneração para as famílias, além de outros benefícios como qualidade de vida e soberania alimentar.

Nos sistemas orgânicos de produção de alimentos, as sementes e mudas devem provir de sistemas também orgânicos, exceto se houver indisponibilidade desses materiais de propagação, ficando vedado o uso de agrotóxicos sintéticos no tratamento e armazenamento de sementes e mudas orgânicas (BRASIL, 2011).

Silva e Machado (2013), elucidam a eficiência e a importância do uso de compostos derivados de plantas, entre eles os óleos essenciais, principalmente nos sistemas de produção orgânica, no tratamento de sementes para o manejo de fitopatógenos. Além de outros organismos, como insetos e bactérias (KNAAK; FIUZA, 2010). Esses compostos podem apresentar ação fungitóxica direta sobre microrganismos e elicitora, através da indução de resistência, ativando os mecanismos de defesa nas plantas (STANGARLIN et al., 2011).

A espécie *Tagetes minuta*, planta aromática, nativa da América do Sul, pertencente à família Asteraceae, popularmente conhecida como chinchilho, chinchila, erva fedorenta, calêndula selvagem, calêndula mexicana, entre outros, apresenta multifuncionalidade, principalmente no que tange ao uso do seu óleo essencial, sendo a sua composição química de natureza majoritariamente terpênica (VASUDEVAN et al., 1997; VISINTIN; BERNARDELLO, 2005; LÓPEZ et al., 2009; GAKUUBI et al., 2016). Em estudos, o óleo essencial vem demonstrando efeitos anti-helmíntico, repelência a insetos, antisséptico, germicida, bactericida, nematicida, inseticida, fungicida, antiviral e potencial para o manejo de fitopatógenos e insetos em sistemas produtivos e no armazenamento, além de parasitas no âmbito da pecuária (GAKUUBI et al., 2016).

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é uma das espécies com relevância social-econômica mais importante para agricultura familiar no Brasil, pois além de ser utilizado para consumo próprio, garantindo a soberania alimentar das famílias de agricultores, também é gerador de renda, através da comercialização (VIEIRA et al., 2005; TARSITANO et al., 2015).

Muitas doenças observadas nos campos de produção de feijão são transmitidas por sementes. Essas doenças assumem importância diferenciada, dependendo da região em que é feito o cultivo, pois o feijão é produzido em diversos ecossistemas, durante todo o ano, sobre várias condições de clima, solo e manejo, além de possuir diversas cultivares, com características genéticas variadas em relação à resistência aos fitopatógenos (CTSBF, 2012).

As doenças, aquelas causadas pelos fungos *Sclerotinia sclerotiorum*, causador do mofo branco, e *Macrophomina phaseolina*, agente da podridão cinzenta, mostraram-se de extrema relevância, pois ambos produzem estruturas de resistência, chamadas escleródios, com potencial de permanência no solo por longos períodos (OLIVEIRA, 2005; GUPTA et al., 2012). *Sclerotinia sclerotiorum*, ocorre em um grande número de países, principalmente em regiões de clima temperado e subtropical (BIANCHINI et al., 1997) e *M. phaseolina* em regiões de clima quente, sendo que no Brasil, os maiores danos ocorrem na região Nordeste, devido às condições climáticas favoráveis, chegando a causar prejuízos consideráveis em diversas culturas (CARDOSO et al., 1996).

Evidenciando-se a importância do cultivo do feijão para a agricultura familiar, a demanda crescente pela busca de alimentos agroecológicos e a necessidade de

estudos que venham a corroborar com a produção de sementes em sistemas orgânicos de produção, objetivou-se avaliar a ação volátil do óleo essencial de *T. minuta*, in vitro, sobre *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* e o efeito da aplicação do óleo essencial de *T. minuta*, via volatilização, em sementes de feijão, no manejo das doenças ocasionadas por *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* e na qualidade fisiológica das sementes.

2 Revisão da Literatura

2.1 Aspectos sobre o feijão

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) pertence à ordem Rosales, família Fabaceae, subfamília Faboidae (VILHORDO et al., 1996). O seu centro de origem, aceito atualmente, é o Continente Americano, sendo que a diversidade genética do feijão pode ser agrupada em três pools gênicos geográficos sendo eles: Mesoamericano (México, América Central e Colômbia), Andino-Sul (sul do Peru, Bolívia e Argentina) e Intermediário (Equador e norte do Peru), que teria derivado dos dois primeiros (ANTUNES, 2008). A domesticação das cultivares de feijão ocorreu de forma múltipla nas Américas, de forma independente dos pools gênicos Mesoamericano, Andino e Intermediário, resultando nos centros primários de domesticação na América Central e no Sul do Peru, e um terceiro, localizado na Colômbia (GEPTS; DEBOUCK, 1991). No entanto, Freitas (2006) sugere que a origem da domesticação foi em único evento, entre o Norte da América do Sul e o México.

O feijão, além de sua importância cultural e nutricional, se destaca pela sua relevância econômica e social no Brasil, pois a produção é realizada predominantemente nos pequenos estabelecimentos agropecuários baseados no trabalho familiar (TARSITANO et al., 2015), sendo igualmente essencial na alimentação, pela garantia da soberania alimentar dessas famílias, e também como fonte geradora de renda, através da venda de seu excedente.

No Brasil, segundo Paula Júnior e Wendland (2012), o feijão é produzido em quatro épocas, conforme a região, que compreendem a primavera-verão, verão-outono, outono-inverno e inverno-verão. A primeira é conhecida como feijão das “águas”, em que a semeadura é realizada entre os meses de outubro e novembro, e a colheita se dá entre janeiro e fevereiro. Nesta época, embora quase não haja necessidade de irrigação, a cultura pode vir a apresentar incidência de fitopatógenos devido a umidade excessiva. Na época verão-outono, comumente chamada de “safrinha”, a semeadura se dá entre fevereiro a março, sendo que pode haver escasses de chuvas e aparecimento de vírus do mosaico dourado (*Bean golden*

mosaic virus), principalmente em áreas em que o feijão sucede a soja, hospedeira da mosca branca, que é vetor do vírus. No período de outono-inverno, o qual demanda alta tecnologia, principalmente no que tange ao manejo de irrigação, a semeadura ocorre entre abril e junho, no entanto em locais que apresentam baixas temperaturas, o plantio não é aconselhável, visto que as doenças mofo-branco e murcha de fusarium podem ser destrutivas. Já, no inverno-verão, a semeadura se dá entre junho e início de agosto havendo economia com irrigação, porém a maturação pode coincidir com o início das chuvas, ademais, evidencia-se a incidência de mofo branco, embora menor que a época anterior, e de ferrugem.

Historicamente, devido a sua boa adaptabilidade às várias condições edafoclimáticas do Brasil, o feijão faz parte da maioria dos sistemas produtivos dos pequenos e médios produtores, sendo que o cultivo na época de inverno (período seco), sob irrigação, vem atraindo médios e grandes produtores, usuários de tecnologia (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). Na safra de 2017-2018, no Brasil, a produção de feijões foi de 3.116,5 mil toneladas (CONAB, 2018), sendo que, segundo a Comissão Técnica Sul-brasileira de Feijão (2010), 60% dessa produção provêm da agricultura familiar. Entretanto, parte dela vem sendo feita em grande escala, o que diminui a representatividade da agricultura familiar, devido à modernização proposta pela revolução verde, com tecnologias não apropriadas aos pequenos produtores e que se mostram mais caras, agressivas e degradantes ao meio ambiente. Ademais, de acordo com Didonet et al. (2009), várias podem ser as causas para a baixa produtividade do feijoeiro-comum na agricultura familiar, como alto custo dos insumos, ausência de controle de pragas e doenças, perda da biodiversidade, sistemas de produção inadequados e insustentáveis e o abandono de práticas de cultivo tradicionais.

2.2 Doenças associadas a sementes de feijão

No cultivo do feijão, o uso de sementes com baixa qualidade, principalmente no que tange os aspectos sanitários, é, possivelmente, como o maior agravante na produção. Se estima que menos de 10% das sementes utilizadas no Brasil são sadias, o que promove a disseminação de fitopatógenos e, por consequência, um aumento

na utilização de agrotóxicos, a iniciar pelo tratamento de sementes, contaminado quem a manuseia, o ambiente e os consumidores (AIDAR; KLUTHCOUSKI, 2009).

Rava e Costa (2009) mencionam que para que haja um avanço para uma agricultura sustentável no âmbito do cultivo do feijão, se faz necessário o uso de práticas intensivas de manejo das áreas, rotações de culturas, preservação dos inimigos naturais e uso de sementes sadias, sendo essa última medida responsável por um aumento no rendimento de até 45%.

As doenças transmitidas por sementes nos sistemas de produção de feijão assumem importância diferenciada, dependendo da região em que é feito o cultivo, pois ele é produzido em diversos ecossistemas, durante todo o ano, sobre várias condições de clima, solo e manejo, além de possuir diversas cultivares, com características genéticas variadas em relação à resistência aos fitopatógenos (CTSBF, 2012).

Os fungos de maior importância em sementes de feijão, segundo o Manual de Análise Sanitária de Sementes, são *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaeoisariopsis griseola*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, *M. phaseolina*, *Rizoctonia solani* e *S. sclerotiorum* (BRASIL, 2009a). Da mesma forma, eles também estão elencados entre as principais doenças do feijão na Região Sul do Brasil, de acordo com a Comissão Técnica Sul-brasileira de Feijão (2012).

2.2.1 Mofo branco no feijão

O mofo branco, causado por *S. sclerotiorum*, é uma doença que afeta a cultura do feijão em todo mundo (FIALHO et al., 2015). Esse fungo pode estar associado a mais de 400 espécies de plantas, tanto cultivadas, como a soja (*Glycine max*), algodão (*Gossypium herbaceum*), alface (*Lactuca sativa*), repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), girassol (*Helianthus annuus*) e ervilha (*Pisum sativum*), como as espontâneas, como o picão (*Bidens pilosa*), carrapicho (*Cenchrus echinatus*), caruru (*Amaranthus viridis*), mentrasto (*Ageratum conyzoides*) e vassoura (*Baccharis spicata*) (PAULA JÚNIOR et al., 2010). No Brasil, a doença se apresenta disseminada na maioria das áreas de produção, podendo ocasionar perdas totais de rendimento em condições ambientais favoráveis (FERREIRA et al., 2014).

Pode se mostrar bastante severa em regiões com temperaturas amenas de 15°C a 20°C e alta umidade, principalmente em áreas irrigadas na safra outono-inverno, como se evidencia no Sudeste e Centro-Oeste, tornando-se ainda mais prejudicial com o crescimento vegetativo abundante da cultura, pouco arejamento, pouca penetração de luz, drenagem deficiente do solo e rotação de culturas inadequadas (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

Sclerotinia sclerotiorum é um fungo habitante do solo, que sobrevive principalmente na forma de escleródios, a sua estrutura de resistência, que inicialmente são claros e depois tornam-se escuros e irregulares com até dois centímetros de comprimento (FIALHO et al., 2015). Podem germinar de forma miceliogênica, produzindo hifas, ou carpogênica, produzindo apotécios, os quais representam a sua fase sexuada. Os apotécios são de formato chato a côncavo, com ascos cilíndricos, medindo de cinco a 15 milímetros de diâmetro, com oito ascósporos cada um, que são elipsoides e hialinos, com dimensões de 4-6 x 9-14 μm (BIANCHINI et al., 1997; PAULA JÚNIOR et al., 2010).

A doença na lavoura geralmente inicia em reboleiras, principalmente nos locais com alta densidade de plantas e com cultivares de feijão de hábito indeterminado (PAULA JÚNIOR et al., 2010). Os sintomas podem ser observados em toda a parte aérea da planta, através de lesões pequenas e aquosas, que aumentam de tamanho e descoloração dos tecidos, que em seguida amarelecem e depois ficam marrons, produzindo uma podridão mole, na qual, sob umidade, desenvolve-se micélio branco e cotonoso, que a partir de seu engrossamento forma os escleródios (BIANCHINI et al., 1997; FIALHO et al., 2015). Eles podem estar presentes nas vagens, juntamente com as sementes. Estas, quando infectadas, tornam-se descoloridas, sem brilho, enrugadas e menores ou podem, até mesmo, não apresentar qualquer sintoma externo. Nesse último caso, tem sido verificado 0,5% de isolamento do fungo em sementes sem nenhum sintoma externo da doença e 12% de sementes com sintoma. Com isso, se evidenciam prejuízos diretos tocantes a menor produtividade e indiretos relativos à condenação de áreas para produção de sementes, aumento do custo de produção e custo ambiental, decorrentes do controle químico (PAULA JÚNIOR et al., 2010).

A penetração do fungo ocorre pelos estômatos e mais frequentemente pela cutícula de forma direta, através de apressórios simples a colchões de infecção, que é dificultada pela necessidade de energia requerida pelo fungo para a produção dos

apressórios e pelo contato físico direto. A colonização se dá através do crescimento das hifas a partir de vesículas localizadas entre a cutícula e a camada de células da epiderme e intercelularmente no córtex, sendo que 48 horas após a penetração ocorre a exteriorização dos sinais do fungo e 3 a 7 dias ocorre a formação de escleródios externa e internamente nos tecidos do hospedeiro. A penetração e a colonização são completadas em 2 a 3 dias, com necessidade de água livre na interface entre o inóculo e o tecido (CARDOSO, 1994). A infecção ocorre geralmente nas axilas das plantas, em torno de 10 a 15 cm acima da linha do solo, onde ficam aderidas folhas e pétalas caídas. A doença torna-se importante no florescimento, pois depois que a florada cai, a doença dissemina-se rapidamente, porque a flor é fonte primária de energia, servindo de energia para o fungo iniciar a infecção (OLIVEIRA, 2005). A produção dos apotécios, necessita de 10 a 14 dias com potencial matricial de água no solo de -250 mb e temperatura entre 15°C a 18°C, sendo inibida com temperaturas acima de 20°C. Para a germinação dos ascósporos a temperatura limitante é acima de 30°C e abaixo de 5°C, sendo o ótimo em torno de 20°C (CARDOSO, 1994). A disseminação ocorre através dos ascósporos via correntes de ar, implementos agrícolas, animais, o homem e nas sementes. Nas sementes a transmissão ocorre via micélio dormente (interno) e via escleródios misturados às mesmas, sendo que uma vez introduzido na área, o patógeno torna-se de difícil erradicação (HENNING et al., 2014). Ademais, o micélio, nas sementes, pode sobreviver na forma dormente por 3 anos e os escleródios, sobreviver no solo, de 6 a 8 anos (BIANCHINI et al., 1997).

No que tange o controle da doença, as dificuldades se mostram na persistência da fonte de inóculo no solo, através dos escleródios, pela ampla gama de hospedeiros do patógeno e pela falta de germoplasma altamente resistente (STEADMAN et al., 2002). Desenvolvimento de cultivares resistentes é a estratégia de gestão da doença mais econômica para o agricultor (STEADMAN et al., 2002). Nesse sentido, muitas linhagens vêm sendo testadas, com foco no melhoramento de cultivares resistentes ao mofo branco (FERREIRA et al., 2014; JHALA et al., 2014; SOFKOVA; KIRYAKOV, 2014). Lima et al. (2013) apontam que uma das estratégias para reduzir a doença e melhorar o rendimento está no desenvolvimento de cultivares de feijão, que combinem a resistência fisiológica e a evasão de arquitetura para o mofo branco. Ademais, faz necessário o uso de sementes não contaminadas, aplicação de fungicidas, rotação de culturas, eliminação de restos culturais, controle da irrigação, utilização de cultivares mais eretas e aumento do espaçamento entre fileiras (CARDOSO, 1994).

2.2.2 Podridão cinzenta do caule

Macrophomina phaseolina, agente causal da podridão cinzenta do caule na cultura do feijão, afeta em torno de 500 outras espécies. Se caracteriza por ser um habitante natural do solo, com grande variabilidade patogênica e alta capacidade de sobreviver sob condições adversas. No Brasil, os maiores danos ocorrem na região Nordeste, devido às condições climáticas favoráveis, chegando a causar prejuízos consideráveis em diversas culturas (CARDOSO et al., 1996).

O fungo apresenta uma grande variabilidade morfológica e genética, com variáveis taxas de crescimento micelial, tempo de formação de picnídios e virulência (PORCH et al., 2014). Sobrevive no solo como saprófita, principalmente na forma de escleródios, por um período de 2 a 15 anos e em sementes assintomáticas na forma de micélio e sintomáticas como escleródios, por um período de até 3 anos (GUPTA et al., 2012). A penetração do fungo ocorre através da pressão mecânica e pela dissolução da parede celular através da secreção das enzimas poligalacturonase e celulase, sendo que o desenvolvimento intercelular do micélio e a sua íntima associação com a parede celular do córtex estão correlacionadas com a concentração de poligalacturonase. A temperatura ideal para a patogenicidade é de 28°C a 35°C com baixa precipitação, pois em ambientes úmidos os escleródios vivem até 2 anos e os micélios por até 7 dias (IJAZ et al., 2013). A infecção ao ocorrer precocemente, via sementes contaminadas ou pelos escleródios e micélio sobreviventes no solo causam os sintomas de cancos pretos deprimidos com bordas bem definidas em anéis concêntricos, que podem rodear o caule, sendo que acima da plântula nota-se amarelecimento e murcha, com conseqüente tombamento. Já nas plantas desenvolvidas, nota-se desenvolvimento lento da doença, ocasionando raquitismo, cloroso e desfolhamento prematuro, sendo que no centro das lesões são encontrados os picnídios e os escleródios. As vagens ao entrarem em contato com o solo contaminado tornam as sementes infectadas devido à invasão do patógeno (CARDOSO et al., 1996).

Ademais, segundo Gupta et al. (2012), vêm sendo desenvolvidas medidas de controle para *M. phaseolina*, as quais incluem a rotação de culturas, plantio direto, irrigação, uso de agentes biológicos no tratamento de sementes e no solo, adubação orgânica, correção do solo, fertilização do solo, densidade de semeadura, solarização,

uso de fungicidas no solo, na parte aérea e nas sementes, uso de reguladores de crescimento e tratamento de sementes com plantas, que apresentem atividade antimicrobiana.

2.3 Óleos essenciais: características gerais e aplicações

Os óleos essenciais apresentam várias formas de uso, sendo principalmente destinados para a indústria farmacêutica, de produtos de limpeza e higiene, de alimentos, de tintas e na agricultura, com foco no controle biológico de doenças e insetos (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

Estes produtos, caracterizam-se por serem a mistura de substâncias voláteis, lipofílicas, de baixo peso molecular, com odor agradável e marcante, na forma líquida. Além disso, são geralmente incolores ou amarelados, com sabor ácido a picante, insolúveis em água e instáveis na presença do ar, luz e calor (MORAIS, 2009).

Os óleos essenciais são provenientes do metabolismo secundário das plantas, que na natureza apresentam funções ecológicas importantes nos vegetais, como atrativos para polinizadores e dispersores de sementes, atuam na competição entre plantas e na simbiose entre plantas e microrganismos, além de protegerem as plantas contra herbívoros e infecções de microrganismos patogênicos (TAIZ; ZEIGER, 2009).

São classificados, quimicamente, nas classes dos terpenos e dos compostos fenólicos (fenilpropanóides). Os terpenos são sintetizados a partir dos isoprenos (5 unidades de carbono) isopentil fosfato (IPP) e dimetil-alil-fosfato (DMAPP), sendo que as rotas de produção do IPP são no citoplasma e no cloroplasto (BIASI; DESCHAMPS, 2009; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os compostos secundários produzidos por todas as plantas variam em qualidade e quantidade de uma espécie para outra, até mesmo na quantidade do metabólito de um local de ocorrência ou ciclo de cultivo para outro, são desencadeados, muitos deles, por fatores externos a que as plantas estão expostas (FERREIRA; ÁQUILA, 2000; MORAIS, 2009). São distribuídos de forma uniforme na planta, pois a sua produção ocorre em órgão, tecido específico ou tipo de célula em determinado estágio de desenvolvimento (RAVEN et al, 2011). No caso dos óleos essenciais, eles são armazenados em estruturas externas, nos tricomas glandulares,

e internas, nas células parenquimatosas diferenciadas, em bolsas esquizógenas (afastamento das células) ou lisígenas (lise das células) e em canais oleíferos, que consistem em espaços alongados no interior dos tecidos (BIASI; DESCHAMPS, 2009).

O uso dos óleos essenciais sobre diversos organismos tais como fungos, insetos e bactérias vêm apresentados resultados promissores em seu controle (KNAAK; FIUZA, 2010). Podendo apresentar ação fungitóxica direta sobre microrganismos e elicitora, através da indução de resistência, ativando os mecanismos de defesa nas plantas (STANGARLIN et al., 2011).

2.3.1 Tratamento de sementes com óleos essenciais

O uso de sementes de baixa qualidade mostra-se como um dos principais facilitadores na ocorrência de doenças na cultura do feijão, sendo que entre as medidas de controle estão o uso de cultivares resistentes (que mesmo sendo uma medida eficaz e econômica, não apresentam resistência a todas as doenças), sementes de boa qualidade fitossanitária, rotação de culturas, eliminação de hospedeiros secundários, época de semeadura adequada, entre outros, além do controle químico, tanto via foliar quanto via semente (MANOS et al., 2013).

A qualidade das sementes é afetada por fatores genéticos intrínsecos às espécies, físicos referentes a impurezas, fisiológicos relacionados ao ambiente de produção, momento da colheita, além do manuseio nas fases de colheita, beneficiamento e armazenamento e fatores sanitários devido ao efeito deletério provocado por microrganismos e insetos desde o campo de produção até o armazenamento (LUCCA FILHO; FARIAS, 2012).

Entre os mecanismos utilizados para minimizar a ação desses organismos está o tratamento químico das sementes, que objetiva a erradicação dos fitopatógenos associados a elas e também de fungos de solo, a fim de garantir proteção às sementes e as plântulas. Além disso, impedir a transmissão de patógenos para a plântula, reduzir a fonte de inóculo, evitando epidemia no campo e reduzir custos com produtos que venham a ser aplicados na parte aérea. As formas de tratamento químico de sementes podem ser via seca e via úmida, sendo o último subdividido em imersão,

slurry, pulverização e outros como peletização e fumigação (LUCCA FILHO; FARIAS, 2012).

Nesse sentido, Silva e Machado (2013), elucidam a eficiência e a importância do uso de compostos derivados de plantas, entre eles os óleos essenciais, no tratamento de sementes para o manejo de fitopatógenos, enfatizando a sua importância, principalmente, nos sistemas de produção orgânica.

Na literatura, alguns trabalhos vêm demonstrando com sucesso o uso desses compostos, agindo positivamente sobre os fitopatógenos, sem alterar a qualidade fisiológica das sementes. A exemplo, Nguetack et al. (2008), ao tratarem sementes de arroz com os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* e *Thymus vulgaris*, encontram efeitos eficientes sobre *Alternaria padwickii*, *Bipolaris oryzae* e *Fusarium moniliforme*, além de melhorias no potencial de germinação das sementes. Já, Van Der Wolf et al. (2008), ao avaliarem os óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Syzygium aromaticum*, *Leptospermum scoparium*, *Origanum vulgare*, *Mentha* sp. e *T. vulgaris* no tratamento de sementes de couve (*Brassica oleracea*), obtiveram resultados promissores sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Alternaria dauci* e *Botrytis aclada*, com efeitos fitotóxicos, somente em altas doses de *C. zeylanicum*. Também, Mbega et al. (2012), chegaram a resultados promissores ao utilizar os óleos essenciais de *Eucalyptus globules* e *Rosmarinus officinalis* no tratamento sementes de tomate reduzindo a incidência e severidade de *Xanthomonas* spp. sem efeitos negativos sobre a qualidade fisiológica das sementes. Ademais, Tagne et al. (2013), tratando sementes de milho (*Zea mays*) com os óleos essenciais de *O. gratissimum* e *C. citratus*, obtiveram efeitos satisfatórios na redução da incidência de *F. moniliforme* e melhorias no potencial de germinação.

A utilização da fase volátil dos óleos essenciais, via fumigação, vêm despertando cada vez mais o interesse de pesquisadores, pois permite uso de concentrações mais baixas em comparação com o uso via contato, possibilidade de uso em diferentes ambientes e inalterações nas propriedades organolépticas de alimentos, sendo que para cada microrganismo e volátil de óleo essencial, estudos são necessários (LAIRD; PHILLIPS, 2011). Além de natureza relativamente não tóxica e degradabilidade (CABRAL et al., 2013).

Nesse contexto, o uso dos óleos essenciais na fase volátil, via fumigação, vem se mostrando com grande potencial no tratamento de sementes e grãos

armazenados, para a redução de fitopatógenos, inclusive os deletérios, produtores de micotoxinas (DHINGRA et al., 2009; MANNAA; KIN, 2017). Esse método, vem apresentando resultados mais eficientes sobre fitopatógenos do que via contato (SOYLU et al., 2010; MA et al., 2015), além de demonstrar menores efeitos negativos sobre a qualidade fisiológica das sementes (MIRANDA et al., 2015). Sendo isso observado por Anžlovar et al. (2017), ao testarem o óleo essencial de *T. vulgaris* no tratamento de sementes de trigo (*Triticum aestivum*) visando o controle dos fitopatógenos *Alternaria alternata*, *Alternaria infectoria*, *Aspergillus flavus*, *Epicoccum nigrum* e *Fusarium poae*, obtendo como resultados, eficiência do tratamento via contato e via fumigação sobre os fitopatógenos, mas apenas via fumigação, nenhuma ação negativa sobre as sementes. No entanto, Karaca et al. (2017), ao testarem diferentes óleos essenciais em sementes de trigo, via contato e fumigação, chegaram a resultados eficientes sobre *Tilletia tritici* com os óleos de *Allium cepa*, *Mentha* sp. e *O. vulgari*, porém redução do potencial germinativo das sementes.

Cabe mencionar, que em sementes, as quais podem vir a serem consumidas, a utilização dos compostos voláteis de óleos essenciais, mostra-se interessante, devido a inexistência de resíduos químicos sintéticos e toxinas produzidas por microrganismos, além de qualidade nutricional e sem alterações nas propriedades organolépticas (DHINGRA et al., 2009; LAIRD; PHILLIPS, 2011), conforme vem sendo demonstrado no manejo pós-colheita com a utilização dos voláteis de *S. aromaticum* e *Brassica nigra* em frutos de morango (*Fragaria ananassa*) (AGUILAR-GONZÁLEZ et al., 2015) e os compostos thymol e linalol em uvas de mesa (*Vitis vinifera*) (SHIN et al., 2014) visando o controle de *Botrytis cinera*. Além dos compostos carvacrol, cinnamon oil, 1,8-cineole, *trans*-cinnamaldehyde, citral, clove oil, *p*-cymene, eugenol, geraniol, (\pm)-limonene, linalool, menthone, (1R)-(+)- α -pinene, (1S)-(-)- α -pinene e β -pinene em frutos de pimenta (*Capsicum annuum*) para o controle de *Colletotrichum gloeosporioides* (HONG et al., 2015).

Por fim, Silva e Machado (2013) enfatizam a importância da determinação da concentração dos compostos secundários, provenientes de plantas, que não sejam tóxicos às sementes, mas sejam eficientes contra aos fitopatógenos. Ademais, mencionam a importância de fatores como tempo de exposição, tecnologia de aplicação dos compostos, tipo de produtos a serem aplicados em mistura ou de forma separada e viabilidade econômica.

2.3.2 Efeito dos óleos essenciais na qualidade fisiológica das sementes

O estudo do potencial dos óleos essenciais no controle de insetos, fitopatógenos e como herbicida já se encontra bastante difundido, principalmente no contexto da produção orgânica (MAIA et al., 2015). Mais especificamente no tratamento de sementes, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos com a finalidade de inibir agentes patogênicos associados às sementes, sem que isso venha a causar danos fisiológicos as mesmas (HILLEN et al., 2012; MONDEGO et al., 2014; SILVA et al., 2014).

A germinação e o vigor são alguns dos elementos, que compõe a qualidade fisiológica das sementes, sendo que o primeiro se baseia na capacidade de a semente dar origem a uma plântula normal, ao passo que, o segundo determina o potencial máximo de desempenho de sementes na germinação e emergência de plântulas (PESKE; BARROS, 2012).

Trabalhos vêm demonstrando que algumas sementes, dependendo das espécies, assim como alguns óleos essenciais, conforme a sua composição, podem ocasionar a queda na germinação e no vigor das sementes, assim como podem potencializar o desenvolvimento inicial de plântulas ou mostrarem-se indiferentes (ALVES et al., 2004; XAVIER et al., 2012; MIRANDA et al., 2015).

No processo de germinação, os compostos secundários podem refletir na modificação da permeabilidade de membranas, que interfere na dormência de sementes, transcrição e tradução do RNA, no funcionamento dos mensageiros secundários, na respiração por sequestro de oxigênio e na conformação de enzimas e receptores, além da ação conjunta desses fatores. Ademais, pode provocar alterações em nível celular, na fotossíntese e na síntese proteica, no metabolismo de lipídios e na atividade enzimática (FERREIRA; ÁQUILA, 2000).

Visando o tratamento de sementes, Aumonde (2012) aponta que os mecanismos de ação e a resposta de determinado composto sobre o vegetal (sementes), podem ser elucidados por estudos relacionando a atividade enzimática, pigmentos fotossintéticos, produção de radicais livres, peroxidação de lipídeos, integridade do sistema de membranas celulares e de outros testes empregados rotineiramente para a avaliação do vigor e germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas.

Durante a germinação, as sementes se mostram menos sensíveis que o desenvolvimento de plântulas. Dessa forma, a incidência de plântulas anormais e a necrose da raiz primária, mostram-se como sintomas importantes, ao passo que, a emergência da raiz deve ser avaliada, seguida de emergência em solo ou areia (FERREIRA; ÁQUILA, 2000). Visto que, as substâncias com potencial aleloquímico, ao agirem sobre o vigor, podem alterar a velocidade e porcentagem de emergência de plântulas e no estande final, ou diretamente, no crescimento das plantas (AUMONDE, 2012).

2.4 *Tagetes minuta* L.

Tagetes minuta é uma espécie vegetal fortemente aromática, nativa da América do Sul, pertence à família Asteraceae, popularmente conhecida como chinchilho, chinchila, erva fedorenta, calêndula selvagem, calêndula mexicana e entre outros (VISINTIN; BERNARDELLO, 2005; CHAMORRO et al., 2008; GAKUUBI et al., 2016). Ela se caracteriza por ser uma planta anual, podendo alcançar até dois metros de altura, sendo suas folhas opostas, elípticas e serrilhadas, as flores de coloração amarela e seus frutos do tipo aquênio na forma de fuso achatado, que medem de 5-8mm de comprimento e 0,6mm de largura (HULINA, 2008). No Rio Grande do Sul, *T. minuta* germina durante o período da primavera e do verão e seu ciclo é de 120 a 150 dias, quando ocorre a formação das sementes (KISSMANN; GROTH, 1995).

A espécie apresenta multifuncionalidade, principalmente no que tange o uso do seu óleo essencial, presente, principalmente, em suas folhas e inflorescências (CHAMORRO et al., 2008; LÓPEZ et al., 2009; GAKUUBI et al., 2016). Gañán (2014) elucida que a composição química do óleo essencial de *T. minuta* é majoritariamente de monoterpenos acíclicos, como o hidrocarboneto insaturado (β -ocimeno) e as cetonas insaturadas (dihidrotagetona, Z- e E-tagetona, Z- e E-ocimenona), que constituem de 75% a 95% de seu total, além de numerosos componentes secundários, como os monoterpenos limoneno, α -felandreno, sabineno, mirceno e entre outros e sesquiterpenos, como α - e β -cariofilenono e espatulenol. Na região sul do Brasil, a espécie demonstrou um padrão no quimiotipo de plantas de *T. minuta*, apresentando como principais constituintes os compostos cis-tagetona, cis- β -

ocimeno, dihidrotagetona, trans-tagetona e limoneno, representando cerca de 96% da composição dos óleos essenciais, além dos compostos bicilogermacreno, sabineno, trans- β -ocimeno, β -cariofileno, 7-epi-silfiperfol-5-eno, α -cariofileno, Octanal, α -felandreno, trans-ocimenona e etil 2-metilbutirato (GOMES, 2017). Muito embora, na mesma espécie, possam ocorrer, em diferentes populações, variações na composição de óleos essenciais, ou seja, quimiotipos, por estímulos ambientais e condições geográficas ou geológicas, que promovem modificações nas rotas de biossíntese ao longo de uma visão evolutiva (SADGROVE; JONES, 2015).

Na região sul do Brasil, a planta é considerada de grande importância, no que tange a sua utilização no manejo da prevenção e controle de doenças e insetos nos sistemas de produção agroecológicos, pois está inserida no conhecimento empírico das famílias de agricultores, que se deu ao longo de gerações (LOVATTO, 2012). Junto a isso, o estudo de seu óleo essencial, vêm demonstrando efeitos anti-helmíntico, repelência a insetos, antisséptico, germicida, bactericida, nematocida, inseticida, fungicida, antiviral, entre outros. Justificando o seu potencial para o manejo de fitopatógenos e insetos em sistemas produtivos e no armazenamento, além de parasitas no âmbito da pecuária (GAKUUBI et al., 2016).

Especificamente, no que tange o manejo de fitopatógenos, alguns trabalhos vêm demonstrando o potencial de *T. minuta*, muito embora ainda incipientes, sobre *Glomerella cingulata* (ROZWALKA et al., 2008), *C. gloesporioides* (ROZWALKA et al., 2008; GIACOMINI et al., 2013), *S. sclerotiorum*, *Sclerotium rolfsii*, *R. solani*, *Fusarium oxysporum pisi*, *Pyricularia grisea* (SAHA et al., 2012), *Phytophthora infestans* (PEREIRA et al., 2013), *C. lindemuthianum* (OLANDA, 2014), e *Cercospora kikuchii* (VICENÇO et al., 2017).

Ademais, outras espécies do gênero *Tagetes* também vêm mostrando capacidade para o manejo fitossanitário em agroecossistemas, a exemplo de *Tagetes erecta*, *Tagetes patula* e *Tagetes tenuifolia* no manejo de fitonematoides (HOOKS et al., 2010), *T. erecta*, *Tagetes lucida*, *Tagetes filifolia* e *T. patula* no manejo de *S. solfsii* e *Monilinia fructicola* (PÉREZ et al., 2011), *T. erecta* no manejo de *X. campestris* pv. *campestris* (DIDWANIA et al. 2013), *T. patula* e *T. erecta* no controle de *Sitophilus zeamais* (SANTOS et al., 2016), assim como, *T. erecta*, no manejo de *Alphitobius diaperinus* (MARCOMINI et al., 2009) e *Spodoptera frugiperda* (SALINAS-SÁNCHEZ et al., 2012).

3 Material e métodos

3.1 Local e período de realização do trabalho

Os experimentos foram realizados nas dependências da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, entre os anos de 2015 e 2017.

3.2 Óleo essencial de *T. minuta*

Plantas de *T. minuta*, em plena floração, foram coletadas no dia 12 de maio de 2015, pelo período da manhã, em área de lavoura anual, com coordenadas 31°31'40,7" na latitude sul e 52°25'31,8" na longitude oeste, no Município de Piratini, RS, Brasil.

Após a coleta, procedeu-se a limpeza do material vegetal fresco através da retirada dos ramos lenhosos, folhas senescentes, folhas doentes e com a presença de insetos, com posterior fragmentação.

A extração do óleo essencial foi feita pelo método de arraste a vapor em equipamento semi-industrial, de inox, da marca Linax. O material vegetal, previamente fragmentado, foi depositado sobre uma tela, fixada acima do depósito de água, que se encontra no fundo do equipamento, a fim de evitar o contato direto entre o material vegetal e a água. Através de aquecimento, a água no estado de vapor, permeou-se no material vegetal arrastando os componentes voláteis até o condensador, que promoveu o resfriamento para a obtenção do estado líquido do óleo essencial e do hidrolato. De posse desses líquidos imiscíveis, procedeu-se a centrifugação e separação do óleo essencial, que foi armazenado em vidro âmbar sobre refrigeração a $-19^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

A identificação da composição do óleo essencial de *T. minuta* foi realizada na Embrapa Agroindústria Tropical por cromatografia gasosa. Para isso, foi utilizado um

cromatógrafo gasoso de espectro de massas (CG-EM), marca Varian, modelo CG-450/MS-240, com impacto de elétrons a 70eV, modo de injeção com divisão de fluxo 1:30, gás carreador com fluxo 1,50 mL min⁻¹, temperatura do injetor de 250°C e temperatura da linha de transferência a 250°C. A programação do forno cromatográfico seguiu em temperatura inicial de 70°C com rampa de aquecimento de 4°C min⁻¹ até 180°C por 27,5min, continuada por rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ até 250°C, ao término da corrida (34,5min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecidos pelo equipamento (NIST versão 2.0 - 287.324 compostos), bem como através da comparação dos seus índices de retenção com os de compostos conhecidos, obtidos por injeção de uma mistura de padrões, e de dados da literatura (ADAMS, 2009).

Foram identificados 15 compostos químicos no óleo essencial da planta inteira de *T. minuta*, sendo eles majoritariamente monoterpenos, entre os quais o cis-β-ocimeno, dihidrotagetona, cis-tagetona, trans-tagetona e limoneno representaram 97,30% da sua composição (Tabela 1).

Tabela 1 - Análise da composição química do óleo essencial de plantas de *Tagetes minuta*, em plena floração, coletadas no Município de Piratini, RS, Brasil (31°31'40,7" S 52°25'31,8" O), em 12 de maio de 2015. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Composto	IR*	(%)	Classificação do composto
Ethyl 2-methylbutyrate	948	0,0422	Outro componente
Sabineno	981	0,4565	Monoterpeno não-oxigenado
Octanal	1006	0,3125	Outro componente
α -felandreno	1012	0,2661	Monoterpeno não-oxigenado
Limoneno	1035	3,4089	Monoterpeno não-oxigenado
Cis- β -ocimeno	1039	35,0738	Monoterpeno não-oxigenado
Trans- β -ocimeno	1049	0,3791	Monoterpeno não-oxigenado
Dihidrotagetona	1054	14,7827	Monoterpeno oxigenado
Cis-tagetona	1158	4,4476	Monoterpeno oxigenado
Trans-tagetona	1148	39,5905	Monoterpeno oxigenado
Trans-ocimenona	1245	0,1280	Monoterpeno oxigenado
7-epi-silphiperfol-5-ene	1354	0,2170	Outro componente
β -cariofileno	1432	0,2878	Sesquiterpeno
α -cariofileno	1466	0,2424	Sesquiterpeno
Biciclogermacreno	1510	0,3650	Sesquiterpeno

*IR: índice de retenção relativo aos n-alcenos C9–C15.

3.3 Obtenção de isolados fúngicos

O isolado monospórico de *M. phaseolina* foi obtido a partir de sementes de feijão branco, da safra 2014-2015, coletadas no Município de Canguçu, RS, Brasil. Para isso, as sementes foram incubadas pelo método Blotter test por um período de 7 dias em câmara de incubação tipo BOD (Biochemical Oxygen Demand) com temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12h (BRASIL, 2009a). Após a identificação do patógeno, fez-se a repicagem para meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Água) para a obtenção de colônia pura.

Já o isolado de *S. sclerotiorum* foi proveniente da Coleção de Trabalho de Microrganismos do Laboratório Biofábrica da Estação Experimental Cascata, Embrapa Clima Temperado.

Eles foram cultivados em meio de cultura BDA por 7 dias após a repicagem, sendo *M. phaseolina* incubado a 30°C no escuro e *S. sclerotiorum* a 22°C e fotoperíodo de 12h. A preservação dos microrganismos, antes da repicagem para a utilização em cada experimento, foi a temperatura de 5°C no escuro.

3.4 Ensaio experimental 1

Nesse ensaio, avaliou-se a ação dos diferentes volumes do óleo essencial de *T. minuta* sobre o crescimento micelial dos fitopatógenos *M. phaseolina* e *S. Sclerotiorum*. Para isso, os microrganismos permaneceram em exposição contínua aos voláteis de diferentes volumes do óleo essencial de *T. minuta* até que as testemunhas apresentaram total crescimento sobre o meio de cultura na placa de Petri. As testemunhas corresponderam ao tratamento em que os patógenos não foram expostos ao óleo essencial. Para *M. phaseolina* foram utilizados os volumes de 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 e 75µL e para *S. Sclerotiorum* de 2, 5, 10, 15 e 20µL do óleo essencial de *T. minuta*. Os volumes de óleo essencial de *T. minuta* foram aplicados sobre papel filtro, fixado internamente à tampa das placas de Petri, contendo meio de cultura BDA, no qual foi inserido um disco de micélio de 5mm para cada fungo. A medição do diâmetro do micélio foi realizada diariamente, em milímetros, através

de duas medidas ortogonais. Os resultados foram apresentados em Taxa de Inibição do Crescimento Micelial (TIC), dada pela fórmula:

$$TIC = \frac{(Diâmetro\ máximo - Diâmetro\ do\ Tratamento)}{Diâmetro\ máximo}$$

3.5 Ensaio experimental 2

Com base nos resultados obtidos no primeiro ensaio, determinou-se a partir de qual volume os patógenos seriam expostos ao óleo essencial de *T. minuta*, agora, por períodos pré-determinados. Para *M. phaseolina* foram utilizados os volumes de 75, 80, 85, 90, 95 e 100µL e para *S. Sclerotiorum* de 10, 15, 20 e 25µL do volume do óleo essencial de *T. minuta*, em ambos casos, por períodos de exposição de 24, 48, 72 e 96h. As testemunhas corresponderam ao tratamento em que os patógenos não foram expostos ao óleo essencial. Para isso, igualmente como já descrito no item 3.4, o óleo foi colocado na parte interna da placa de Petri sobre papel filtro, no entanto, ao terminar o tempo de exposição, as tampas foram substituídas por outras sem a presença do óleo essencial. As medidas ortogonais do diâmetro foram realizadas diariamente por um período de 30 dias após a inoculação. Para o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, ao término dos 30 dias, realizou-se a contagem do número de escleródios formados e o peso, em gramas, que foi determinado em balança de precisão. Já, para *M. phaseolina*, devido ao baixo número de esporos formados durante esse período, não se realizou a contagem de esporos. Os resultados do crescimento micelial foram apresentados em Taxa de Inibição do Crescimento Micelial (TIC), conforme já apresentado no item 3.4 e o número e peso de escleródios em Taxa de Número de Escleródios (TNE) e Taxa de Massa de Escleródios (TME), pelas fórmulas:

$$TNE = \frac{N^{\circ}\ de\ Escleródios\ do\ Tratamento}{N^{\circ}\ Máximo\ de\ escleródios}$$

$$TME = \frac{Massa\ de\ Escleródios\ do\ Tratamento}{Massa\ Máxima\ de\ escleródios}$$

3.6 Ensaio experimental 3

3.6.1 Sementes de feijão

As sementes de feijão utilizadas foram a cultivar BRS Exedito e uma população de sementes de Carioca, a primeira obtida com o Programa de Melhoramento da Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Terras Baixas e a segunda por meio da União das Associações Comunitárias do Interior de Canguçu (UNAIC), ambas da safra 2015/2016, armazenadas desde o beneficiamento até o uso em câmara de conservação de sementes.

3.6.2 Inoculação de sementes com os fitopatógenos

Inicialmente, as sementes passaram por um processo de assepsia com álcool etílico a 50% por um minuto, seguido de hipoclorito de sódio a 1%, pelo mesmo período, e três lavagens consecutivas com água destilada estéril. Após, elas permaneceram sobre papel filtro e ventilação forçada, em câmara de fluxo laminar, até secagem.

A inoculação das sementes de feijão com *M. phaseolina* se deu pelo contato direto em colônia fúngica, conforme metodologia adaptada de Balandrán e Pérez (2008), a partir de testes laboratoriais preliminares. Para isso, 30 sementes foram alocadas e levemente pressionadas sobre colônia fúngica, crescida nas condições descritas no item 3.3, sendo o contato mantido entre o fungo e as sementes por 24h, nas mesmas condições em que ocorreu o crescimento fúngico.

Para a inoculação das sementes com *S. sclerotiorum*, também se utilizou o método de contato direto, com base na metodologia de Venturoso et al. (2015), com modificações, a partir da qual 30 sementes foram mantidas sobre a colônia fúngica, crescida nas mesmas condições descritas no item 3.3, sendo o contato mantido entre

o fungo e as sementes de 24h, nas mesmas condições em que ocorreu o crescimento fúngico.

Após a inoculação, as sementes permaneceram em estufa à temperatura de 35°C até atingirem umidade entre 11 e 13% (ANDRADE et al., 2006), avaliada pelo método da estufa a alta temperatura (130-133°C) (BRASIL, 2009b).

3.6.3 Tratamento de sementes

O tratamento foi realizado em recipientes de vidro com capacidade de 600mL. O óleo essencial foi alocado no fundo dos recipientes e as sementes postas em tecido voal preso com a tampa, a fim de mantê-las suspensas sobre o óleo, sem o contato, para proporcionar maior penetração dos gases nas sementes, que permaneceram nessa condição por um período de 24h, em BOD a 25°C no escuro, com base na metodologia descrita por Rodrigues et al. (2006), porém modificada. Os tratamentos foram compostos de diferentes volumes de óleo essencial de *T. minuta* em um número fixo de 100 sementes, sendo o menor volume baseado nas avaliações in vitro realizadas anteriormente no item 3.5, levando-se em consideração a proporcionalidade dos recipientes placa de Petri, utilizada nos testes in vitro, que abrange um volume de 100mL, e o vidro, utilizado para tratar as sementes, com volume de 600mL. O tratamento de sementes foi realizado em sementes não inoculadas e em sementes inoculadas, sendo o controle das sementes não inoculadas composto por sementes na condição natural e das inoculadas sem a exposição ao óleo essencial. Para *M. phaseolina* os volumes de óleo essencial de *T. minuta* utilizadas nos tratamentos foram 600 (menor dose efetiva conforme resultado obtido no teste “in vitro”, item 3.5), 1200, 2400 e 4800µL por 24 horas. Já, para *S. Sclerotiorum* foram os volumes de 150 (menor dose efetiva conforme resultado obtido no teste “in vitro”, item 3.5), 300, 600 e 1200µL por 24 horas de exposição.

3.6.4 Sistematização do experimento

Em recipientes de polietileno com volume de 250mL alocados sobre bancada, as sementes foram semeadas em substrato composto por substrato comercial Ecocitrus e de vermiculita fina (1:1). Foram colocadas 8 sementes por recipiente, com posterior umedecimento do substrato com 200mL de água destilada, que foi realizado com auxílio de proveta.

Os recipientes permaneceram envolvidos por sacos de polipropileno com fecho zip por um período de sete dias, sendo em seguida abertos para proporcionar melhor crescimento das plantas, que para as sementes inoculadas com *M. phaseolina* se deu até os 15 dias e com *S. sclerotiorum* até aos 21 dias após a semeadura, quando o experimento foi encerrado. Durante esse período foram realizadas regas semanais com um volume de 100mL em cada recipiente.

3.6.5 Avaliações realizadas

3.6.5.1 Comprimento de parte aérea e raiz

Ao final do experimento, o comprimento de parte aérea foi medido pela distância entre a porção basal da raiz primária ao ápice da parte aérea e o comprimento da raiz primária pela distância entre a parte apical e basal. Os resultados foram expressos em centímetros por planta.

3.6.5.2 Massa seca de parte aérea e raiz

Após as medições, as plântulas foram colocadas em envelopes de papel e postas para secar em estufa de ventilação forçada a 70°C até adquirirem massa

constante (72 horas). Os resultados foram expressos em miligramas por planta (AUMONDE, 2012).

3.6.5.3 Incidência de doença

A incidência de doença foi definida através da contagem de plantas com sintomas da doença. Os valores foram expresos em Taxa de Incidência de Doença (TID), conforme a fórmula abaixo:

$$TIN = \frac{\text{Inciência de Doença do Tratamento}}{\text{Incidência Máxima de Doença}}$$

3.6.5.4 Severidade de doença

A severidade de doença foi avaliada pela escala descritiva proposta por Schoonhen e Pastor-Corrales (1987), que apresenta valores de 1 a 9 graus, conforme descrito para *M. phaseolina* (Tabela 2) e *S. sclerotiorum* (Tabela 3).

De posse dessas notas, para o calculado do Índice de Doença, também conhecido como Índice de Mc. Kinney, foi utilizada a equação (BALARDIN; PASTOR-CORRALES, 1990; MAFIA et al., 2007):

$$ID = \frac{\sum(\text{grau da escala} \times n^{\circ} \text{ respectivo de plantas})}{\text{grau máximo} \times n^{\circ} \text{ total de plantas}}$$

A partir da qual, os valores foram apresentados em taxa de índice de doença (TID), conforme a equação abaixo:

$$TID = \frac{\text{Índice de Doença do Tratamento}}{\text{Índice Máximo de Doença}}$$

Tabela 2 - Escala para avaliação da severidade de *Macrophomina phaseolina* em feijão. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Grau	Caracterização
1	Planta completamente livre de sintomas visíveis da doença
3	Sintomas restritos aos cotilédones
5	Aproximadamente 10% do hipocótilo coberto com lesões
7	Aproximadamente 25% do hipocótilo ou ramos inferiores cobertos com lesões
9	Aproximadamente 50% ou mais do hipocótilo ou ramos inferiores cobertos com lesões

Fonte: Schoonhen e Pastor-Corrales (1987).

Tabela 3 - Escala para avaliação da severidade de *Sclerotinia sclerotiorum* em feijão. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Grau	Caracterização
1	Planta completamente livre de sintomas visíveis da doença
3	Aproximadamente 5 a 10% da planta com sintomas
5	Aproximadamente 20 a 30% da planta com sintomas
7	Aproximadamente 40 a 60% da planta com sintomas
9	Mais de 80% da planta com sintomas

Fonte: Schoonhen e Pastor-Corrales (1987).

3.7 Procedimento experimental e análise estatística

O delineamento experimental adotado em todos os ensaios foi inteiramente casualizado com 6 repetições. As equações de regressão foram realizadas por meio do software Action Stat (versão 3.5.152.34 build 4, R versão 3.3.2) (EQUIPE ESTATCAMP, 2014). Em todos os ensaios foram utilizados modelos lineares generalizados com distribuição Beta. Para isso, os valores de TIC, TNE, TME, TIN e TID foram transformados, afim de evitar a presença de zeros e uns, pela equação:

$$y'' = \frac{[y(N - 1) + 0,5]}{N}$$

onde y'' é o novo valor, y é o valor a ser transformado, N é o número total de observações e 0,5 é um valor constante (SMITHSON; VERKUILEN, 2006). De forma geral, essa transformação afeta os valores a partir da terceira casa após a vírgula e permite que y'' se torne maior que zero e menor que um.

A análise de componentes principais (ACP) foi realizada por meio do programa CANOCO 4.5 (TER BRAAK; ŠMILLAUER, 2002).

4 Resultados e discussão

4.1 Avaliação do efeito biológico de voláteis de óleo essencial de *T. minuta* sobre *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*

A exposição in vitro dos fungos *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* aos compostos voláteis do óleo essencial de *T. minuta*, ao final de 72 horas, que correspondeu ao tempo necessário para a testemunha completar o seu crescimento micelial máximo, na área estipulada pelo diâmetro da placa de petri, através do modelo de regressão generalizada de distribuição Beta, apresentou efeitos significativos sobre a taxa de inibição do crescimento micelial, conforme demonstrado na Tabela 4. Os valores significativos dos p-valores das equações atestam a eficiência do volátil do óleo sobre o crescimento micelial de ambos patógenos, que são legitimados pelo elevado grau de predição dos efeitos dado pelo $pseudoR^2$ e pelos baixos valores do critério de informação de Akaike (AIC). A significância para *M. phaseolina* foi superior, possivelmente, devido a maior quantidade de volumes utilizados, os quais foram baseados em testes laboratoriais preliminares.

Tabela 4 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta baseados na distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial (TIC) de *Sclerotinia sclerotiorum* (n=5) e *Macrophomina phaseolina* (n=12) após 72 horas de exposição aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Patógeno	Função de ligação	Coefficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC
<i>S. sclerotiorum</i>	Log-log	Int -1,1502	0,1560	1,67e ⁻¹³	0,7964	-10,5072
		V _{μL} 0,4960	0,0471	5,67e ⁻²⁶		
<i>M. phaseolina</i>	Log-log	Int -1,7120	0,1419	1,54e ⁻³³	0,9397	-44,9231
		V _{μL} 0,0718	0,0039	3,52e ⁻⁷⁵		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

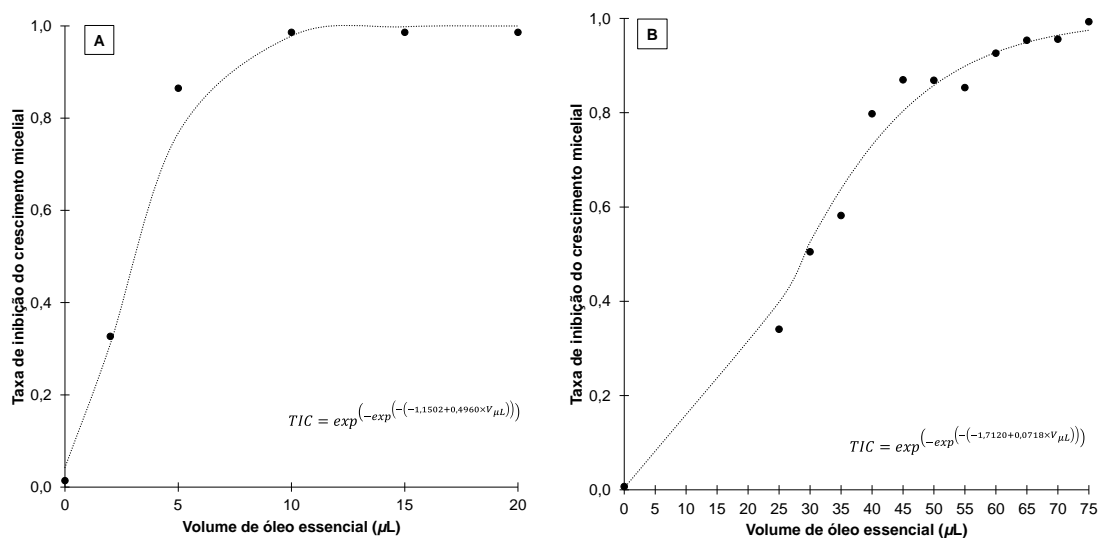


Figura 1 – Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC) sobre *Sclerotinia sclerotiorum* [A] (n=5) e sobre *Macrophomina phaseolina* [B] (n=12) após 72 horas de exposição aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial (OE) de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Pelos gráficos, pode-se verificar que houve um aumento da eficiência do volátil do óleo essencial frente aos patógenos à medida que os volumes de tratamento aumentaram. Para *S. sclerotiorum*, 50% da TIC foi atingida com volumes em torno de 3 e 4 μ L, ao passo que, inibições maiores que 90% foram alcançadas com valores ao redor de 7 μ L (Figura 1A), sendo que, em valores absolutos, a inibição total do patógeno foi alcançada com 10 μ L (Anexo A). Para *M. phaseolina*, a TIC de 50% do patógeno se deu próxima a 29 μ L do óleo essencial, sendo que para inibições acima de 90%, o volume foi em torno de 56 μ L (Figura 1B). Já, em valores absolutos, a inibição foi de 100% no volume de 75 μ L (Anexo A). Nesse contexto, Saha et al. (2012), na Índia, ao avaliarem também o óleo essencial de *T. minuta* sobre *S. sclerotiorum*, porém via contato, encontraram inibições de 50% do crescimento micelial do patógeno com 175 μ g mL⁻¹ com o óleo essencial de folhas e com 489 μ g mL⁻¹ com o extrato de tiofeno proveniente das raízes, mas apenas 8,9% de inibição com 1000 μ g mL⁻¹ do óleo essencial das inflorescências. Ademais, esses autores também evidenciaram efeitos satisfatórios sobre *S. rolfsii* e *R. solani*, ao empregarem o óleo essencial das folhas e o extrato de raiz, assim como resultados mais eficazes para *F. oxysporum* e *Pyricularia oryzae* ao testarem o óleo essencial das inflorescências.

O conhecimento sobre a atividade antifúngica do óleo essencial de *T. minuta* ainda é bastante incipente. No entanto, outros trabalhos vêm sanando essa deficiência, a exemplo de Vicenço et al. (2017), no Brasil, que evidenciaram 100% de inibição do crescimento micelial de *C. kikuchii* com 200 μ L do óleo essencial de *T. minuta*, previamente autoclavado, in vitro, via contato. Ademais, Rozwalka et al. (2008), no Brasil, ao testarem a fase volátil do óleo essencial de *T. minuta*, observaram sobre *C. gloeosporioides*, efeitos fungistáticos ao utilizarem 30 μ L do óleo essencial. Giacomini et al. (2013), também no Brasil, ao testarem o óleo essencial de *T. minuta* sobre *C. gloeosporioides*, porém pelo método de contato, chegaram a inibição total do crescimento micelial com a dose de 10 μ L.

As diferenças de resultados verificadas na literatura podem estar relacionadas a patogenicidade do fungo (PORCH et al., 2014), a fatores intrínsecos ao óleo essencial, como genética da planta utilizada, local, época e momento de coleta, forma de extração e armazenamento (CORNELIUS; WYCLIFFE, 2016; SHAHZADI et al., 2016; GOMES, 2017), além do manuseio pré-tratamento e método de avaliação da capacidade antifúngica (SARMENTO-BRUM et al., 2013). No que se refere ao método de avaliação, especificamente, pela característica volátil dos óleos essenciais,

possivelmente o uso dessa fase poderá apresentar resultados mais eficientes, pois, segundo Inouye (2003a), os compostos voláteis dos óleos essenciais ao agirem de forma livre podem atingir os patógenos alvos, que em solução aquosa, tendem a se associar para formar micelas, principalmente na presença de detergentes e materiais lipofílicos, anulando a ação dos componentes do óleo essencial sobre os organismos alvo. Dessa forma, justifica-se a utilização do método de volatilização empregado no trabalho em questão, que foi balizado, anteriormente, em ensaio laboratorial. Ao encontro disso, Ma et al. (2015), na China, obtiveram efeito mais eficiente da fase volátil do óleo essencial de *Anethum graviolens*, in vitro, sobre *S. sclerotiorum*, que pelo método de contato. Esse efeito também foi demonstrado por Soyly et al. (2007), na Turquia, testando os óleos essenciais de *Origanum syriacum* var. *bevanii* e *Foeniculum vulgare* sobre esse mesmo patógeno. No entanto, Sarmiento-Brum et al. (2013), ao testarem métodos de fungitoxicidade de óleos essenciais, enfatizaram que tais óleos permitem comparações entre si, sendo que o tipo de método a ser utilizado deve procurar se aproximar ao máximo da aplicabilidade na cultura objeto, além de se adequar em termos de viabilidade e facilidade de execução, condizente com a realidade do pesquisador.

Em relação a atividade antifúngica de outros óleos essenciais sobre os fitopatógenos em estudo, no caso *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, Edris e Farrag (2003), no Egito, em teses laboratoriais in vitro, via volatilização, concluíram que nos óleos essenciais de *O. basilicum* e *Mentha* sp., o composto mentol, assim como a mistura dos compostos linalol e eugenol e mentona e mentol, a partir dos volumes de $30\mu\text{L } 400\text{mL}^{-1}$ de ar, inibiram o crescimento fúngico de *S. sclerotiorum*, além de também se mostrarem eficientes sobre o crescimento de *Rhizopus stolonifer* e *Mucor* sp. Fonseca et al. (2015), no Brasil, via contato, verificaram que o óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* inibiu completamente o crescimento de *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, além dos fitopatógenos *F. oxysporum*, *F. solani*, *Sclerotinia minor*, *R. solani* e *S. rolfsii* na concentração de 3000mg L^{-1} , ao passo que o crescimento de *S. rolfsii*, foi inibido a 100% com 1000mg L^{-1} . Também, na mesma concentração, o óleo essencial de *Schinus terebinthifolius*, reduziu 27% o crescimento de *F. solani* e 74% de *R. solani*, sendo que, o óleo de *Porophyllum ruderale* reduziu 72% do crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, 80% de *R. solani* e 82% de *M. phaseolina*. Por sua vez, Tofiño-Rivera et al. (2016), na Colômbia, em testes laboratoriais, via contato, chegaram 54,7 e 97,5% de inibição do crescimento micelial de *M. phaseolina* ao

utilizarem as concentrações de 800 e 1200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial de *C. citratus*, respectivamente. Martins et al. (2010), no Brasil, in vitro, via contato, verificaram que o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* inibiu completamente crescimento micelial de *A. alternata*, *M. phaseolina* e *S. sclerotiorum* na concentração de 0,4% e promoveu sensibilidade à 0,2%. Ademais, Khaledi et al. (2014), no Irã, também in vitro, via contato, para inibição de 50% do crescimento micelial de *M. phaseolina*, fez uso das doses de 459ppm do óleo essencial de *Mentha piperita*, 500ppm do óleo essencial de *Bunium persicum*, 700ppm do óleo essencial de *T. vulgaris* e de 300ppm do composto mentol, além de evidenciarem alterações na morfologia das hifas do patógeno, como coagulação citoplasmática, lise da parede celular e fragmentação de hifas.

Cabe ressaltar ainda, através da observação dos dados brutos do trabalho, (Anexo A), que os compostos voláteis do óleo essencial de *T. minuta*, ocasionaram comportamentos diferenciados de crescimento micelial dos fitopatógenos ao longo do tempo de exposição, em função dos volumes de óleo essencial utilizados, evidenciando um retardo do crescimento micelial nos maiores volumes do óleo essencial em um mesmo tempo de observação. Para *S. sclerotiorum*, no volume de 2 μL , o crescimento micelial ocorreu nas primeiras 24h, ao passo que, no volume de 5 μL se deu em 72h. De forma semelhante, mas menos abrupto entre os volumes, o crescimento micelial de *M. phaseolina* ocorreu em 48h nos volumes até 55 μL e em 72h entre os volumes de 60 e 70 μL .

4.2 Relação volume-resposta do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* em função do tempo de exposição e volume de óleo essencial de *T. minuta*

Com base nos dados obtidos da exposição de *S. sclerotiorum* aos diferentes tempos e volumes do óleo essencial de *T. minuta*, elaborou-se três possíveis modelos de regressão generalizada de distribuição Beta, os quais apresentaram efeitos significativos, no que tange a TIC de *S. sclerotiorum* (Tabela 5).

Dessa forma, para o ajuste dos dados ao melhor modelo de regressão, analisou-se os diferentes parâmetros estatísticos, afim de verificar o quão cada elemento é importante na composição da equação, visto que os p-valores foram

significativos para todos eles. No primeiro modelo, estão todos os elementos, entre eles o intercepto, o volume de óleo essencial, o tempo de exposição ao volume e a interação entre esses dois últimos elementos, no caso, volume e tempo de exposição. No segundo modelo, a interação volume e tempo de exposição foi retirada e no terceiro modelo manteve-se apenas o elemento volume e intercepto. Desse modo, ao analisarmos o modelo completo, com todos os elementos (modelo 1), verificamos que pelo valor do pseudoR² a equação possui em torno de 90% de explicação, ao passo que, ao excluir-se o elemento interação volume e tempo de exposição, no modelo 2, essa explicação é reduzida em torno de 9%. No modelo 3, a retirada do elemento exposição, reduziu a explicação ao redor de 4% em comparação com o modelo 2. Com isso, pode-se inferir que a interação volume e tempo de exposição mais o elemento exposição contribuem cerca de 13% para a explicação dos dados na equação, sendo que o elemento interação volume e tempo de exposição é mais decisivo do que o elemento exposição sozinho.

Ademais, levando-se em consideração que o valor mais baixo de AIC entre as equações foi a do modelo 1, com todos os elementos, evidenciou-se que tal modelo ajustou de forma mais concisa os dados da TIC, sendo ele representado, abaixo, na equação com a função de ligação Complemento Log-log e com os coeficientes calculados:

$$TIC = 1 - \exp\left(-\exp\left(-3,5633 + 0,1845 \times V\mu L + 0,0297 \times Eh - 0,0012 \times V\mu L \times Eh\right)\right)$$

Tabela 5 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* e tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Modelo	Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC	
Modelo 1	Complemento log-log	Int	-3,5633	0,2613	$2,37e^{-42}$	0,9094	-263,2070
		V _{μL}	0,1845	0,0133	$1,78e^{-43}$		
		E _h	0,0297	0,0038	$5,64e^{-15}$		
		V _{μL} :E _h	-0,0012	0,0002	$3,18e^{-09}$		
Modelo 2	Complemento log-log	Int	-2,3529	0,1573	$1,39e^{-50}$	0,8132	-228,4821
		V _{μL}	0,1195	0,0071	$9,59e^{-64}$		
		E _h	0,0076	0,0014	$6,81e^{-08}$		
Modelo 3	Logito	Int	-2,3813	0,2350	$3,91e^{-24}$	0,7717	-200,4448
		V _{μL}	0,1942	0,0145	$7,20e^{-41}$		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critérios de informação de Akaike.

Na Figura 2, é apresentado o gráfico que mostra a qualidade do ajuste do modelo escolhido para explicar a TIC de *S. sclerotiorum*, a partir da regressão linear obtida entre os valores observados e os valores preditos do modelo.

A partir do modelo de equação (modelo 1), determinado para a TIC de *S. sclerotiorum*, verifica-se que a combinação entre o tempo e o volume interferiram na inibição do crescimento micelial do patógeno (Tabela 5). No volume de 25 μ L, a qualquer tempo de exposição, a inibição foi de 100%, logo não se faz necessário volumes maiores e nem tempos de exposição superiores a 24h, nesse volume, para o controle desse fungo, sendo isso, também observado nos dados brutos do trabalho (Anexo B). No entanto, para volumes inferiores a esse, o tempo mostra-se como elemento chave para uma ação efetiva do volátil do óleo essencial de *T. minuta* sobre o crescimento micelial, pois para atingir em torno de 92% de eficiência com o volume de 20 μ L, por exemplo, são necessárias 120h, da mesma forma que para obter-se ao redor de 93% de inibição com o volume de 15 μ L são necessárias 144h.

Expandindo a compreensão das interações existentes entre o comportamento do crescimento micelial e a exposição aos diferentes tempos e volumes do óleo essencial de *T. minuta*, foram elaborados modelos de regressão, isolando-se os efeitos do volume de óleo essencial e o tempo de exposição, aos quais *S. sclerotiorum* foi submetido (Tabela 6). Nesse caso, foram usados os valores médios de cada tratamento, o que em princípio aumentou os valores dos *pseudoR*², no que se refere os elementos em separado. Em ambos os casos, quanto maiores os volumes e tempos de exposição, maiores foram as TIC (Figura 3), sendo que, analisando-se o volume isoladamente, a TIC chegou a valores próximos de 93,76% no tratamento de 25 μ L (Figura 3A). Já, observando-se somente o tempo de exposição, ficaram em torno de 87,84% com 96h de exposição (Figura 3B), com menores percentuais no que se refere ao volume do que no modelo 1 (Tabela 5), em que os elementos foram trabalhados conjuntamente, e aos dados brutos do estudo (Anexo B), muito embora os percentuais no tempo de exposição de 96h mostrem-se quase equiparados.

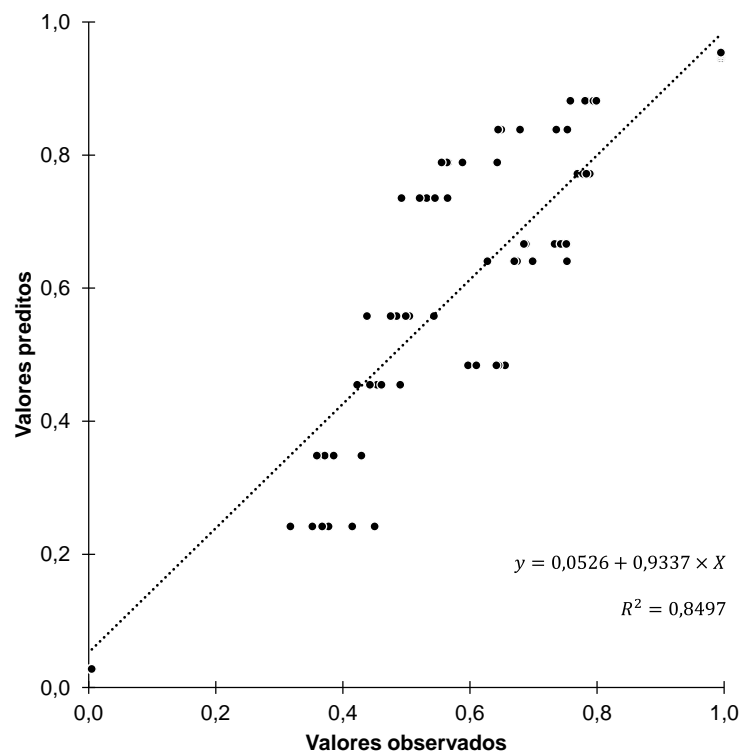


Figura 2 – Qualidade do ajuste da equação de regressão para a taxa de inibição do crescimento de *Sclerotinia sclerotiorum* submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* e em diferentes tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Tabela 6 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial (TIC) de *Sclerotinia sclerotiorum*, obtidos a partir dos valores médios observados e de forma separada para o volume de óleo essencial de *Tagetes minuta* (n=5) e tempo de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável	Função de ligação	Coefficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC	
Volume	Logito	Int	-2,8534	0,8291	5,78e ⁻⁰⁴	0,8881	-8,2275
		V _{μL}	0,2226	0,0548	4,93e ⁻⁰⁵		
Exposição	Log-log	Int	-0,9411	0,3104	0,0024	0,7762	-3,0654
		E _h	0,0311	0,0076	4,27e ⁻⁰⁵		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

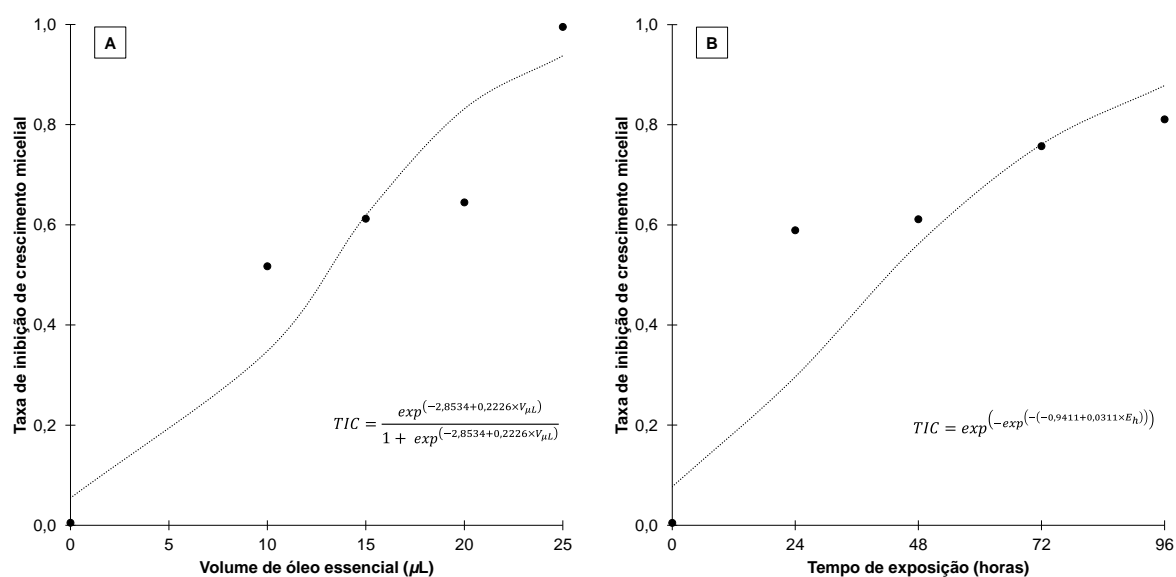


Figura 3 – Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), pelo volume de óleo essencial [A] (n=5) e pelo tempo de exposição [B](n=5), de *Sclerotinia sclerotiorum* submetida aos voláteis de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Ao desmenbrar ainda mais essa compreensão do comportamento biológico, são apresentados modelos de regressão generalizada de distribuição Beta para todos os tempos, dentro da variável volume de óleo essencial, e para todos os volumes, dentro da variável tempo de exposição (Tabela 7). Nesse contexto, os dados da TIC de *S. sclerotiorum* em cada tempo de avaliação, dentro da variável volume, apresentaram p-valores significativos e com $pseudoR^2$ e AIC semelhantes para o ajuste das regressões. Da mesma forma, foram ajustadas regressões para os diferentes volumes de óleo essencial, dentro da variável exposição, com exceção do volume de 25 μ L, devido a inibição total do crescimento micelial desse nas primeiras 24h, conforme pode-se observar nos dados brutos do trabalho (Anexo B). Na figura 4A, é notório que em todos os tempos de exposição a inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* aumentou com o a elevação do volume de óleo essencial de *T. minuta*. No entanto, o que se faz importante frizar é que, a medida que o tempo de exposição aumentou o volume para atingir maior controle do patógeno diminuiu. Os modelos dos tempos de exposição 24 e 48h comportaram-se de forma semelhante, de modo que, entre esses tempos, a resposta de volume foi bastante parecida. Já, em relação aos tempos de 72 e 96h, os quais também apresentaram certa semelhança, evidenciou-se uma resposta mais eficiente de volume, dentro de uma certa faixa, tendendo a igualarem-se com as primeiras horas em volumes ao redor de 25 μ L (Figura 4A). No que diz respeito ao volume de óleo essencial, identificou-se que em todos eles, quanto maior o tempo de exposição, maior a TIC de *S. sclerotiorum* (Figura 4B). Assim como já havia se relacionado anteriormente na avaliação isolada dos volumes (Figura 4A). No entanto, observou-se maior inibição do crescimento micelial até as 48h de exposição, para todos os volumes, a partir da qual a eficiência tendeu a diminuir, de modo que, entre a exposição de 24 e 48h as inibições chegaram próximas a 20,8, 25,6 e 24,9%, passando para em torno de 20,1, 21,3 e 20,2%, entre 48 e 72h, e chegando ao redor de 15,28, 13,58 e 12,91%, nos volumes de 10, 15 e 20 μ L, respectivamente (Figura 4B).

Tabela 7 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, obtidos a partir dos valores médios observados para os diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* (n=5) e tempos de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável		Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC	
Volume (μL)	24h	Complemento log-log	Int	-3,0117	0,6716	7,31e ⁻⁰⁶	0,8900	-8,7290
			V _{μL}	0,1639	0,0342	1,59e ⁻⁰⁶		
	48h	Complemento log-log	Int	-2,9785	0,6308	2,34e ⁻⁰⁶	0,8960	-9,4439
			V _{μL}	0,1647	0,0322	3,15e ⁻⁰⁷		
72h	Logito	Int	-2,5616	0,8353	2,16e ⁻⁰³	0,8785	-7,7741	
		V _{μL}	0,2191	0,0570	1,22e ⁻⁰⁴			
96h	Logito	Int	-2,5331	0,8018	1,58e ⁻⁰³	0,8962	-8,7477	
		V _{μL}	0,2345	0,0568	3,63e ⁻⁰⁵			
Exposição (horas)	10μL	Log-log	Int	-1,0905	0,2401	5,60e ⁻⁰⁶	0,8367	-5,7683
			E _h	0,0245	0,0050	7,98e ⁻⁰⁷		
	15μL	Log-log	Int	-1,0675	0,2548	2,79e ⁻⁰⁵	0,8552	-5,4601
			E _h	0,0296	0,0058	3,39e ⁻⁰⁷		
	20μL	Log-log	Int	-0,9695	0,2936	9,61e ⁻⁰⁴	0,7890	-3,4640
			E _h	0,0288	0,0068	2,52e ⁻⁰⁵		
	25μL	Log-log	Int	-0,0112	0,6807	0,9869	0,5000	-17,0602
			E _h	0,0236	0,0142	0,0978		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

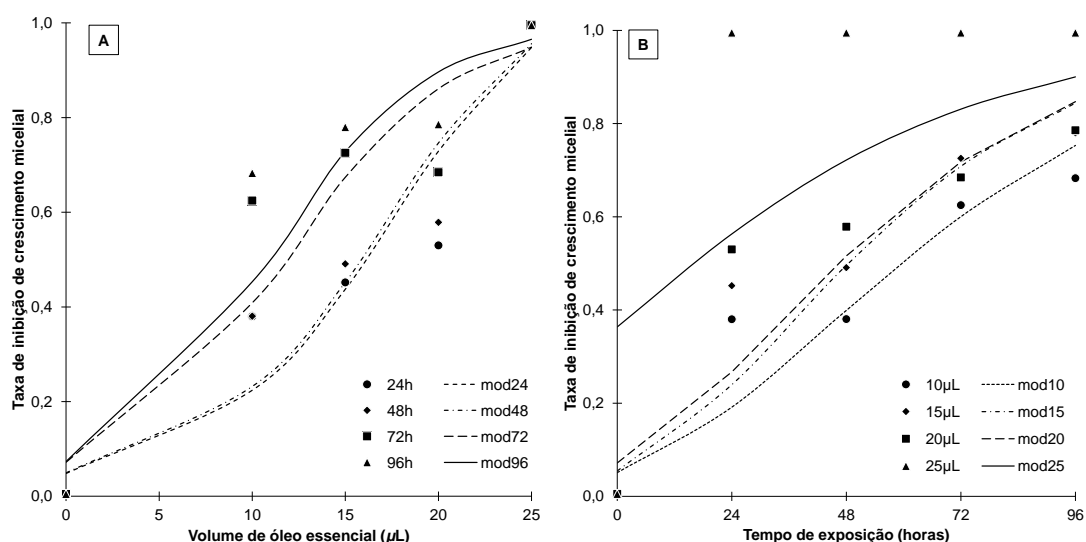


Figura 4 – Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), pelos volumes de 10, 15, 20 e 25μL óleo essencial [A] (n=5) e pelos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h [B](n=5), de *Sclerotinia sclerotiorum* submetida aos voláteis de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

No que se refere ao número e peso de escleródios de *S. sclerotiorum*, formados 30 dias após a exposição aos diferentes tempos e volumes do óleo essencial de *T. minuta*, analisou-se os parâmetros estatísticos envolvidos na construção dos modelos de regressão generalizada de distribuição Beta, afim de ajustar os dados da Taxa de Número de Escleródios (TNE) e da Taxa de Massa de Escleródios (TME) ao melhor modelo matemático. Na Tabela 8, são apresentados os três modelos de regressão com os possíveis elementos de compor a equação de cada uma das variáveis. No entanto, nenhum dos modelos conseguiu explicar a relação entre os elementos, pois muito embora os p-valores tenham se mostrado significativos, os *pseudoR*², apresentaram valores baixos de explicação. Já, na Figura 5, são apresentados os gráficos que mostram a baixa qualidade do ajuste dos modelos para explicar a TNE (A) e da TME (B) de *S. sclerotiorum*, a partir da regressão linear obtida entre os valores observados e os valores preditos dos modelos.

No entanto, afim de aprofundar a compreensão dos efeitos biológicos do tratamento com os voláteis do óleo essencial de *T. minuta* sobre a reprodução do patógeno *S. sclerotiorum*, na Tabela 9, são apresentados os modelos de regressão obtidos para a TNE e TME quando foram isolados os efeitos do volume de óleo essencial e do tempo de exposição, aos quais *S. sclerotiorum* foi submetido. Nesse caso, foram usados os valores médios de cada tratamento, o que aumentou os valores dos *pseudosR*². Para ambas as variáveis, os p-valores mostraram-se significativos aos elementos volume e exposição, sendo que para a TNE o modelo ajustado para o elemento volume apresentou 9% de explicação a mais em relação ao elemento exposição, ao passo que, para a TME o elemento exposição ganhou relevância na reprodução do patógeno, até então pouco significativo para o crescimento fúngico, pois a explicação do modelo foi em torno de 4% a mais em comparação ao elemento volume, corroborando com o menor valor do AIC.

Na Figura 6, são mostrados os gráficos dos modelos para a TNE e TME, a partir dos quais observa-se, que as taxas caíram com o aumento do volume e da exposição ao óleo essencial. A TNE, conforme o modelo na figura 6A, apresentou reduções em torno de 14,37% no volume de 10µL, 28,55% no volume de 15µL e de 48,56% com 20µL, sendo que na TME, na figura 6C, as quedas foram ao redor de 18,64, 35,27 e 56,55% nos volumes de 10, 15 e 20µL, respectivamente.

Tabela 8 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa do número de escleródios (TNE) e para a taxa da massa de escleródios (TME) de *Sclerotinia sclerotiorum*, submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* e tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável	Modelo	Função de ligação	Coefficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC	
TNE	Modelo 1	Complemento log-log	Int	0,4092	0,2103	0,0517	0,5597	-93,6619
			V _{μL}	-0,0602	0,0166	0,0003		
			E _h	0,0151	0,0046	0,0010		
			V _{μL} :E _h	-0,0010	0,0003	0,0024		
	Modelo 2	Complemento log-log	Int	0,7476	0,1633	4,71e ⁻⁰⁶	0,5089	-85,5019
			V _{μL}	-0,0955	0,0121	2,90e ⁻¹⁵		
			E _h	0,0025	0,0026	0,3480		
	Modelo 3	Complemento log-log	Int	0,8199	0,1498	4,43e ⁻⁰⁸	0,5039	-86,6303
			V _{μL}	-0,0913	0,0101	1,66e ⁻¹⁹		
TME	Modelo 1	Complemento log-log	Int	0,5021	0,1895	0,0081	0,5635	-117,317
			V _{μL}	-0,0614	0,0153	6,18e ⁻⁰⁵		
			E _h	0,0070	0,0046	0,1240		
			V _{μL} :E _h	-0,0009	0,0003	0,0055		
	Modelo 2	Complemento log-log	Int	0,7831	0,1546	4,06e ⁻⁰⁷	0,5310	-111,091
			V _{μL}	-0,0916	0,0116	2,36e ⁻¹⁵		
			E _h	-0,0040	0,0026	0,1312		
	Modelo 3	Complemento log-log	Int	0,6449	0,1556	3,40e ⁻⁰⁵	0,5377	-110,788
			V _{μL}	-0,0967	0,0105	2,69e ⁻²⁰		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critérios de informação de Akaike.

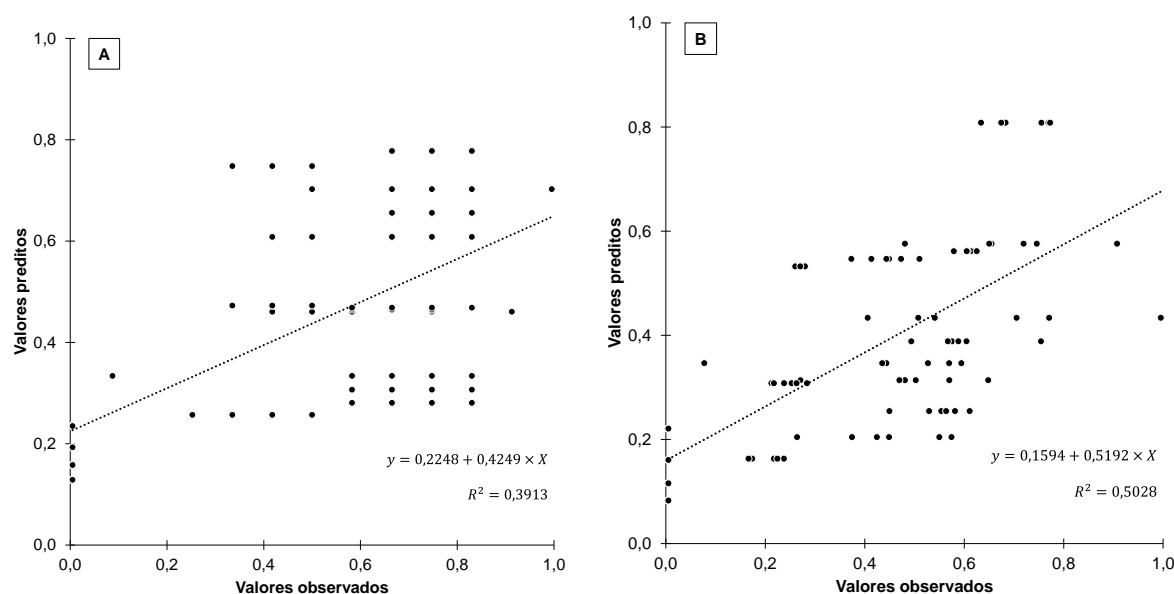


Figura 5 – Qualidade do ajuste das equações de regressão para a taxa de número de escleródios (A) e para a taxa de massa de escleródios (B) de *Sclerotinia sclerotiorum* submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* e em diferentes tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Tabela 9 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de número de escleródios (TNE) e a taxa de massa de escleródios (TME) de *Sclerotinia sclerotiorum*, obtidos a partir dos valores médios observados e de forma separada para o volume de óleo essencial de *Tagetes minuta* (n=5) e tempo de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável	Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	<i>pseudoR</i> ²	AIC		
TNE	Volume	Int	2,6892	0,6879	$9,26e^{-05}$	0,7374	-0,6591	
		$V_{\mu L}$	-0,1189	0,0348	$6,34e^{-04}$			
	Exposição	Complemento log-log	Int	0,5830	0,1965	0,0030	0,6468	-3,8879
			E_h	-0,0105	0,0036	0,0034		
TME	Volume	Int	2,2926	0,4355	$1,40e^{-07}$	0,8977	-4,2656	
		$V_{\mu L}$	-0,1113	0,0224	$7,14e^{-07}$			
	Exposição	Logaritmo	Int	-0,1235	0,0340	$2,74e^{-04}$	0,9349	-10,9202
			E_h	-0,0102	0,0011	$2,52e^{-21}$		

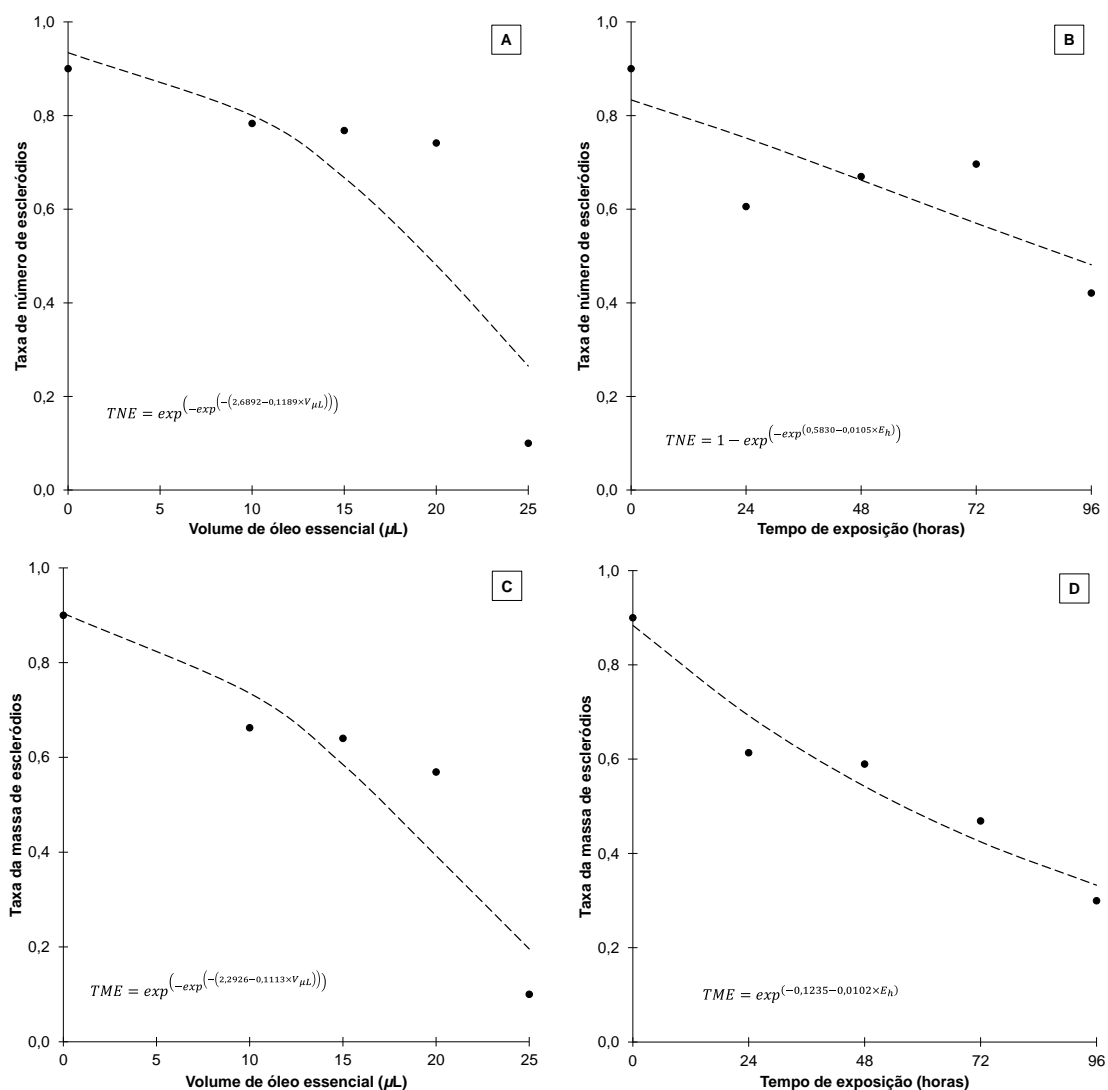


Figura 6 – Relação volume-resposta para a taxa de número de escleródios (TNE), pelo volume de óleo essencial [A] (n=5) e pelo tempo de exposição [B] (n=5), e para a taxa de massa de escleródios (TME), pelo volume de óleo essencial [C] (n=5) e pelo tempo de exposição [D] (n=5), de *Sclerotinia sclerotiorum* submetida aos voláteis de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Em valores absolutos, o número de escleródios caiu 1,29, 1,46 e 1,75 e o peso 16,33, 17,88 e 22,76g nos volumes de 10, 15 e 20 μ L, respectivamente, no entanto esses valores foram nulos no volume de 25 μ L, devido ao não crescimento do patógeno (Anexo C). Quanto ao tempo de exposição, até então não efetivo no que tange a eficiência sobre o manejo do patógeno, demonstrou reduções de 9,76, 20,57, 31,61 e 42,24% na TNE nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h, respectivamente (Figura 6B). Quanto à TME, evidenciou-se maior sensibilidade do patógeno, visto que nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h as reduções no peso foram de 21,68, 38,65, 51,93 e 62,35%, na sequência (Figura 6D). Sendo que, em valores absolutos, o número de escleródios caiu 3,25, 2,54, 2,25 e 5,29 e a massa 19,71, 21,34, 29,66 e 41,29g nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h (Anexo C).

Adentrando, ainda mais na compreensão do comportamento biológico, são apresentados modelos de regressão para todos os tempos, dentro da variável volume de óleo essencial, e para todos os volumes, dentro da variável tempo de exposição (Tabela 10). Os dados da TNE de *S. sclerotiorum* em cada tempo de avaliação, dentro da variável volume, apresentaram p-valores significativos para as regressões generalizadas de distribuição Beta, no entanto, somente nas 96h, a equação demonstrou melhor ajuste dos dados, sendo que essa obteve 22, 31 e 35% a mais de explicação em comparação com os tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Já para os diferentes volumes de óleo essencial dentro da variável tempo de exposição os p-valores não mostraram significância (Tabela 10). Quanto aos dados da TME de *S. sclerotiorum* em cada tempo de avaliação, dentro da variável volume, apresentaram p-valores significativos, sendo que em 96h o ajuste dos dados demonstrou 28, 30 e 17% a mais de explicação em comparação com os tempos de 24, 48 e 72h, na sequência. Na variável exposição, os p-valores para cada volume também foram significativos, com exceção de 25 μ L, devido ao não crescimento do patógeno neste tratamento (Anexo C). Os *pseudoR*² e o AIC das equações dos volumes de 10 e 15 μ L foram semelhantes e demonstraram maior explicação em comparação com a de 20 μ L (Tabela 10).

Tabela 10 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de número de escleródios (TIN) e taxa de massa de escleródios (TIM) de *Sclerotinia sclerotiorum*, obtidos a partir dos valores médios observados para os diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* (n=5) e tempos de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

	Variável	Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	<i>pseudoR</i> ²	AIC	
TNE	Volume (μL)	24h Log-log	Int	1,8219	0,6677	0,0064	0,5737	-0,1952
			V _{μL}	-0,1036	0,0354	0,0034		
		48h Log-log	Int	1,9769	0,7566	0,0090	0,4781	0,8019
			V _{μL}	-0,1063	0,0398	0,0077		
	72h Log-log	Int	2,0206	0,7914	0,0107	0,4363	1,1301	
		V _{μL}	-0,1063	0,0417	0,0107			
	96h Log-log	Int	1,2727	0,4180	2,33e ⁻⁰³	0,7889	-4,2934	
		V _{μL}	-0,0911	0,0231	7,92e ⁻⁰⁵			
	Exposição (horas)	10μL Logaritmo	Int	-0,3032	0,1116	0,0066	0,3846	-2,1727
			E _h	-0,0029	0,0022	0,1842		
15μL Logaritmo		Int	-0,3132	0,0839	0,0002	0,4666	-5,1402	
		E _h	-0,0030	0,0017	0,0680			
20μL Logaritmo		Int	-0,3204	0,1103	0,0037	0,4353	-2,5504	
		E _h	-0,0036	0,0022	0,1046			
25μL Logaritmo		Int	-0,9034	0,5425	0,0958	0,5000	-14,2701	
		E _h	-0,0235	0,0123	0,0555			
TME	Volume (μL)	24h Log-log	Int	2,0069	0,6450	0,0019	0,6152	-1,1333
			V _{μL}	-0,1141	0,0339	0,0008		
		48h Log-log	Int	1,7164	0,6235	0,0059	0,5990	-0,6603
			V _{μL}	-0,1008	0,0332	0,0024		
	72h Log-log	Int	1,3161	0,4710	0,0052	0,7222	-2,8893	
		V _{μL}	-0,0899	0,0258	0,0005			
	96h Log-log	Int	0,9110	0,2643	5,68e ⁻⁰⁴	0,8957	-8,8297	
		V _{μL}	-0,0858	0,0154	2,78e ⁻⁰⁸			
	Exposição (horas)	10μL Log-log	Int	1,2964	0,1003	3,00e ⁻³⁸	0,9457	-13,8995
			E _h	-0,0155	0,0015	3,59e ⁻²⁵		
		15μL Log-log	Int	1,2439	0,1010	7,65e ⁻³⁵	0,9533	-13,6293
			E _h	-0,0155	0,0015	1,14e ⁻²⁴		
		20μL Log-log	Int	0,9753	0,1733	1,82e ⁻⁰⁸	0,8406	-7,3145
			E _h	-0,0134	0,0027	4,96e ⁻⁰⁷		
25μL Log-log		Int	-0,2559	0,4803	0,5942	0,5000	-13,7569	
		E _h	-0,0075	0,0064	0,2405			

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

Na Figura 7, são apresentados os gráficos dessas regressões, onde para a TNE de *S. sclerotiorum* em cada tempo de avaliação, dentro da variável volume, se nota um comportamento decrescente do número de escleródios em todos os tempos, sendo que na equação de 96h, com melhor ajuste dos dados, a tendência foi de cair 26, 42, 58 e 69% com os volumes de 10, 15, 20 e 25 μ L, respectivamente (Figura 7A). Na Figura 7B, também se evidenciou a mesma tendência de decréscimo, muito embora as equações não tenham se mostrado significativas.

Já na Figura 7C, a TME de *S. sclerotiorum* em cada tempo de avaliação, dentro da variável volume, tendeu a diminuir com o aumento dos volumes. No tempo de exposição de 24h a taxa tendeu a decrescer 24,88, 45,63 e 69,31% nos volumes de 10, 15, 20 μ L, na mesma sequência. Na exposição de 48h, essa queda foi de 26,86, 47,04 e 68,95% nos volumes de 10, 15 e 20 μ L, respectivamente. Sendo, na exposição de 72h, na mesma sequência anterior, 32,36, 53,49 e 74,14%, que para as 96h tendeu a 42,07, 65,14 e 84%. Na Figura 7D, a TME de *S. sclerotiorum* em cada volume de avaliação, dentro da variável tempo de exposição, tenderam a diminuir com o aumento dos tempos, com exceção de 25 μ L devido ao não crescimento fúngico neste volume, conforme já mencionando anteriormente. No volume de 10 μ L, a TME decresceu em 11,57, 26,01, 42,85 e 60,72% nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h, respectivamente, sendo que para o volume de 15 e 20 μ L as reduções foram, na sequência, de 12,18, 27,24, 44,62 e 62,73%, para o primeiro, e de 13,29, 28,78, 45,69 e 62,62%, para o segundo.

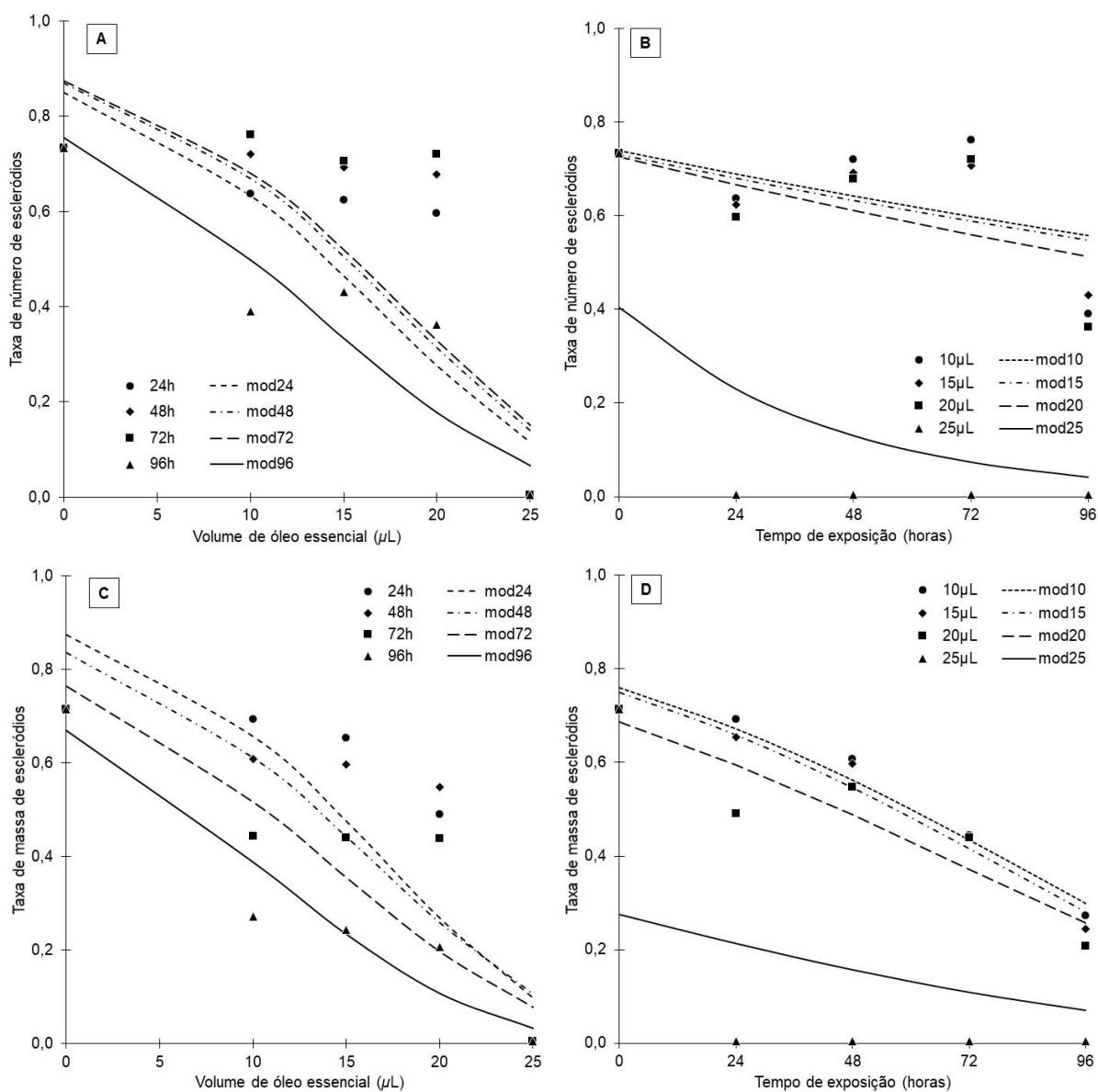


Figura 7 – Relação volume-resposta para a taxa de inibição de número de escleródios, pelos volumes de 10, 15, 20 e 25 μL de óleo essencial [A] (n=5) e pelos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h [B] (n=5), e para a taxa de inibição da massa de escleródios, pelos volumes de 10, 15, 20 e 25 μL de óleo essencial [C] (n=5) e pelos tempos de exposição 24, 48, 72 e 96h [D] (n=5), de *Sclerotinia sclerotiorum* submetida aos voláteis de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

A exposição do fitopatógeno *M. phaseolina* aos diferentes volumes de óleo essencial de *T. minuta* e tempos em relação a esses, promoveu inibição do crescimento micelial do fungo, assim como também evidenciado para *S. sclerotiorum*. Ao ajustar-se os dados ao melhor modelo de regressão, analisou-se os diferentes parâmetros estatísticos. Na Tabela 11, os três modelos de regressão são apresentados com os possíveis elementos de compor a equação, sendo que todos apresentaram p-valores significativos. O modelo 1, composto por todos elementos, apresentou em torno de 97% de explicação e o modelo 2, no qual excluiu-se a interação entre os elementos, demonstrou ao redor de 9% a menos de explicação. Já, o modelo 3, foi inferior em torno de 6% em relação ao modelo 2. Da mesma forma, como já evidenciado para o fitopatógeno *S. sclerotiorum*, os elementos interação volume e tempo de exposição e o elemento volume, representaram 15% a mais de explicação nas equações, muito embora a interação tenha papel de maior relevância (Tabela 11).

Dessa forma, o modelo escolhido que melhor se ajustou aos dados de TIC a partir do volume de óleo essencial e do tempo de exposição, conforme o menor valor de AIC, está apresentado abaixo (modelo 1):

$$TIC = \exp(-5,8223 + 0,0580 \times V_{\mu L} + 0,0479 \times E_h - 0,0005 \times V_{\mu L} \times E_h)$$

Na Figura 8, o gráfico mostra a qualidade do ajuste do modelo escolhido para explicar a TIC de *M. phaseolina*, a partir da regressão linear obtida entre os valores observados e os valores preditos do modelo.

Tabela 11 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* e tempos de exposição (n=150). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Modelo	Função de ligação	Coefficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC	
Modelo 1	Logaritmo	Int	-5,8223	2,55e ⁻⁰¹	5,82e ⁻¹¹⁵	0,9666	-371,2423
		V _{μL}	0,0580	2,58e ⁻⁰³	2,20e ⁻¹¹¹		
		E _h	0,0479	3,32e ⁻⁰³	4,77e ⁻⁴⁷		
		V _{μL} :E _h	-0,0005	3,37e ⁻⁰⁵	9,56e ⁻⁴⁶		
Modelo 2	Complemento log-log	Int	-4,7595	0,2853	1,72e ⁻⁶²	0,8773	-268,4528
		V _{μL}	0,0519	0,0032	1,01e ⁻⁵⁹		
		E _h	0,0079	0,0012	1,63e ⁻¹⁰		
Modelo 3	Complemento log-log	Int	-4,0847	0,3001	3,43e ⁻⁴²	0,8199	-235,0206
		V _{μL}	0,0494	0,0034	5,03e ⁻⁴⁸		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critérios de informação de Akaike.

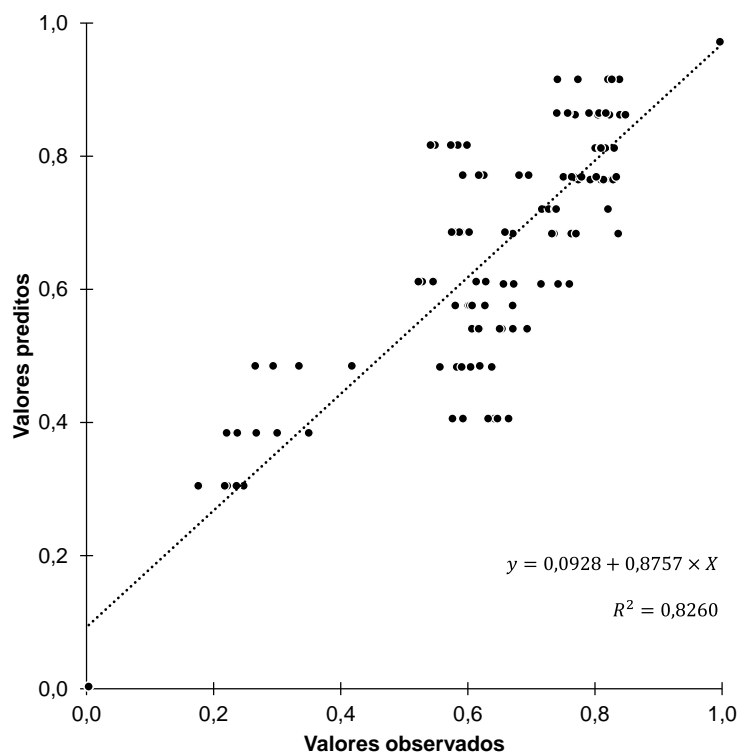


Figura 8 – Qualidade do ajuste da equação de regressão para a taxa de inibição do crescimento de *Macrophomina phaseolina* submetido aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* e em diferentes tempos de exposição (n=150). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Através do modelo escolhido, conforme demonstrado acima, pode-se observar que o aumento dos volumes do óleo essencial de *T. minuta* tendeu a aumentar a TIC de *M. phaseolina*, sendo que o tempo de exposição apresentou maior contribuição sobre a inibição em volumes abaixo de 100 μ L, ao passo que, após esse volume, tendeu a perder a eficiência. Isso pode ser observado, por exemplo, no volume de 90 μ L, em que a TIC aumentou de 74% em 24h, para 75% em 48 e 72h, mas chegou a 76% em 96h. Já, em 100 μ L, a TIC caiu de 93% nas 24h, para 88, 84 e 80% em 48, 72 e 96h, respectivamente. Dessa forma, assim como para o patógeno *S. sclerotiorum*, o efeito do tempo de exposição ao óleo essencial parece ter maior efeito inibitório sobre o patógeno em volumes abaixo de um certo limite, o qual mostrou-se inferior para *S. sclerotiorum*, no caso 25 μ L. No entanto, diferentemente do observado para esse patógeno, ao analisar-se a equação composta pela interação volume e tempo de exposição, não se chegou a um volume de controle, que independe do tempo utilizado, mas sim a uma tendência de perda de eficiência da ação do volátil com a aumento do tempo, após determinado ponto, conforme foi evidenciado, para *S. sclerotiorum*, quando os elementos foram analisados em separado. Doravante, muito embora a tendência dos dados através da equação escolhida tenha se figurado dessa forma, cabe ressaltar, que através da observação dos dados brutos do trabalho, no volume de 100 μ L não houve crescimento micelial do patógeno durante os 30 dias em que o mesmo permaneceu incubado após o tratamento (Anexo D).

Dando sequência à compreensão do comportamento biológico dos dados do trabalho, na Tabela 12, são apresentados os modelos de regressão obtidos quando foram isolados os efeitos do volume de óleo essencial e do tempo de exposição, aos quais o patógeno foi submetido. Nesse caso, foram usados os valores médios de cada tratamento, o que em princípio aumentou os valores dos *pseudoR*². Sendo que, a equação que mais ajustou os dados foi a do volume, com 14% a mais de explicação em comparação com a equação do tempo de exposição. Os gráficos dos modelos para a TIC de *M. phaseolina* são mostrados na Figura 9, a partir dos quais, analisando-se somente o volume, evidenciou-se que para atingir 50% da TIC foram necessários volumes ao redor de 75 e 76 μ L, sendo que para inibição maior que 90% foi preciso volumes próximos a 98 μ L (Figura 9A). Já em relação ao tempo, para atingir 50% da TIC foram necessários tempos em torno de 41h e para inibição superior a 90% um período ao redor de 95h (Figura 9B).

Tabela 12 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, obtidos a partir dos valores médios observados e de forma separada para o volume de óleo essencial de *Tagetes minuta* (n=5) e tempo de exposição (n=7). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável	Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC
Volume	Complemento log-log	Int -4,3010	0,8872	1,25e ⁻⁰⁶	0,9705	-12,9629
		V _{μL} 0,0524	0,0102	2,58e ⁻⁰⁷		
Exposição	Log-log	Int -1,0573	0,2798	1,57e ⁻⁰⁴	0,8321	-5,1911
		E _h 0,0351	0,0071	8,18e ⁻⁰⁷		

Legenda: Int, intercepto; V_{μL}, volume de óleo essencial em μL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critérios de informação de Akaike.

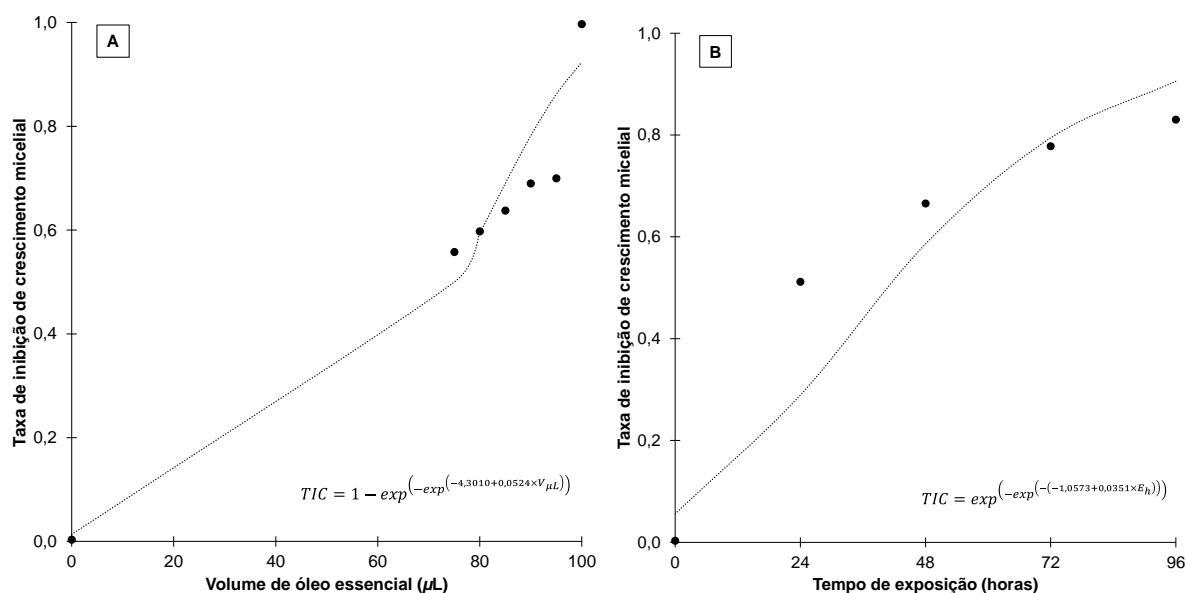


Figura 9 – Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial (TIC), pelo volume de óleo essencial [A] (n=7) e pelo tempo de exposição [B] (n=5), de *Macrophomina phaseolina* submetida aos voláteis de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

De forma mais detalhada, são apresentados modelos de regressão para todos os tempos, dentro da variável volume de óleo essencial, e para todos os volumes, dentro da variável tempo de exposição, utilizados no experimento (Tabela 13). Para a variável volume, os p-valores de todos os tempos de exposição mostraram-se significativos com $pseudoR^2$ maiores que 90%. Já para a variável exposição, os p-valores dos volumes foram significativos, com exceção de 100 μ L, devido ao não crescimento fúngico nesse tratamento (Anexo D).

As equações são representadas na Figura 10, através das quais verifica-se que, tanto os tempos de exposição, na variável volume, quanto os volumes, na variável tempo, tenderam a aumentar a TIC de *M. phaseolina*, a medida em que, as variáveis aumentaram. Sendo que, com o aumento do tempo de exposição, o volume para atingir maior controle do patógeno diminuiu. Assim, como já observado, anteriormente, para *S. sclerotiorum*. Dessa forma, para visualização em valores, nos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h chegou-se a inibições próximas de 25,02, 51,54, 57,64 e 64,12% no volume de 75 μ L e ao redor de 79,37, 82,05, 90,61 e 92,54% no volume de 95 μ L, respectivamente (Figura 10A). Ademais, assim como também já evidenciado para *S. sclerotiorum*, em todos os volumes, houve uma maior eficiência dos compostos voláteis do óleo essencial de *T. minuta* até 48h de exposição. A partir do qual, tendeu a diminuir, visto que, entre 24 e 48h de exposição, as inibições ficaram próximas a 26,07, 29,09, 29,74, 27,83 e 25,73%, passando, entre 48 e 72h, para em torno de 22,98, 23,55, 22,50, 20,54 e 19,63% e, entre 72 e 96h, chegando ao redor de 14,87, 13,71, 12,52, 11,73 e 11,92% nos volumes de 75, 80, 85, 90 e 95 μ L, na sequência mencionada (Figura 10B).

Tabela 13 – Parâmetros estatísticos dos modelos volume-resposta com distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de inibição de crescimento micelial de *Macrophomina phaseolina*, obtidos a partir dos valores médios observados para os diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* (n=5) e tempos de exposição (n=5). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável		Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC
Volume (µL)	24h	Complemento	Int -7,6280	1,0085	$3,93e^{-14}$	0,9399	-7,2992
		log-log	V _{µL} 0,0851	0,0113	$5,82e^{-14}$		
	48h	Complemento	Int -3,5600	0,9582	$2,03e^{-04}$	0,9415	-8,6427
		log-log	V _{µL} 0,0432	0,0111	$9,89e^{-05}$		
72h	Complemento	Int -3,9514	0,7754	$3,47e^{-07}$	0,9768	-17,1697	
	log-log	V _{µL} 0,0507	0,0089	$1,44e^{-08}$			
96h	Complemento	Int -3,4595	0,7572	$4,90e^{-06}$	0,9705	-17,3661	
	log-log	V _{µL} 0,0465	0,0088	$1,23e^{-07}$			
Exposição (horas)	75µL	Log-log	Int -1,2255	0,2227	$3,75e^{-08}$	0,8770	-8,0288
			E _h 0,0305	0,0049	$5,13e^{-10}$		
	80µL	Log-log	Int -1,2608	0,1935	$7,18e^{-11}$	0,9253	-10,1545
			E _h 0,0339	0,0044	$1,12e^{-14}$		
	85µL	Log-log	Int -1,1817	0,2255	$1,61e^{-07}$	0,8941	-8,0628
			E _h 0,0347	0,0054	$1,23e^{-10}$		
90µL	Log-log	Int -1,0063	0,3002	$8,02e^{-04}$	0,7981	-4,0873	
		E _h 0,0326	0,0075	$1,23e^{-05}$			
95µL	Log-log	Int -0,9152	0,3381	$6,78e^{-03}$	0,7210	-2,4252	
		E _h 0,0301	0,0083	$2,82e^{-04}$			
100µL	Logito	Int -0,2963	1,0106	0,7694	0,5000	-19,8198	
		E _h 0,0237	0,0174	0,1744			

Legenda: Int, intercepto; V_{µL}, volume de óleo essencial em µL; E_h, tempo de exposição em horas; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

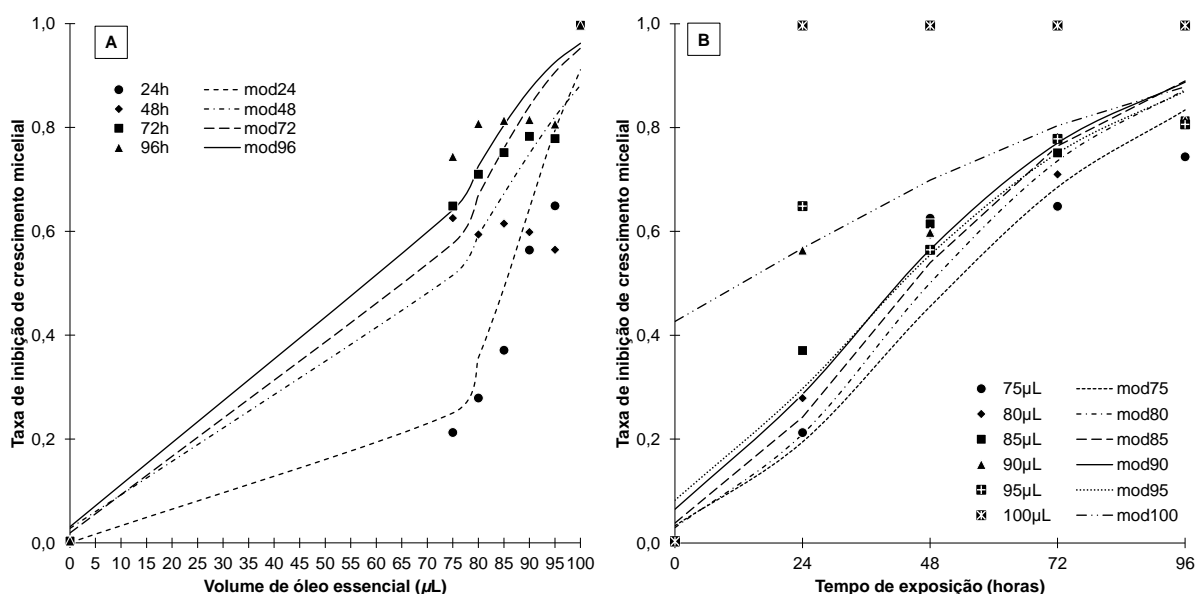


Figura 10 – Relação volume-resposta para a taxa de inibição do crescimento micelial, pelos volumes de 75, 80, 85, 90, 95 e 100µL de óleo essencial [A] (n=5) e pelos tempos de exposição de 24, 48, 72 e 96h [B](n=5), de *Macrophomina phaseolina* submetida aos voláteis de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Com base na observação das análises realizadas, pode-se inferir que o volume do óleo essencial de *T. minuta* se mostra como fator primordial para a inibição do crescimento micelial dos patógenos em estudo, muito embora a exposição figure-se como um meio de contenção do crescimento. Esse efeito também foi observado por Aguilar-González et al. (2017), ao testarem a fase volátil do óleo essencial de *B. nigra* sobre frutos de tomate com diferentes volumes e tempos de exposição, visando a inibição do crescimento de *Aspergillus niger*. Ademais, Abd-Alla et al. (2006), ao tratarem bulbos de celola (*Allium cepa*) com os voláteis dos óleos essenciais de *T. vulgaris* e *C. citratus* para o mesmo patógeno, nos volumes de 100, 150, 200 e 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ (v/v) em câmara de fumigação por 60min, evidenciaram nos volumes de 200 e 400 $\mu\text{L L}^{-1}$ (v/v) inibição total do patógeno, mesmo com o passar do tempo de estocagem dos materiais vegetais, mas em volumes menores a esse, perda da eficiência do tratamento com o passar do tempo de armazenamento.

Ao encontro disso, em relação à possível perda de eficiência do óleo essencial de *T. minuta*, com o passar do tempo de exposição, frente a ambos os fitopatógenos do estudo, pressupõe-se que tal fato, possa estar relacionado com a característica que os óleos essenciais são suscetíveis a reações de conversão e degradação, quando processos oxidativos e de polimerização podem ocasionar a perda da qualidade, principalmente, devido a exposição a luminosidade, temperatura e disponibilidade de oxigênio, entre outros (TUREK; STINTZING, 2013). Sendo, esse efeito também evidenciado por Rodrigues et al. (2006), ao avaliarem o efeito do volátil do óleo essencial de *O. gratissimum* no tratamento de sementes de trigo nos tempos de exposição de 7, 14, 21 e 28 dias, visando o controle de *Bipolaris sorokiniana*. Esses autores, ao utilizarem 2mL de óleo essencial, para cada 100 sementes, através do método de tratamento semelhante ao utilizado nesse estudo, conforme descrito no item 3.6, concluíram que a exposição das sementes por um período de 7 dias aos voláteis do óleo essencial, apresenta menor colonização do patógeno ao ser comparado com os maiores tempos e a testemunha.

No que se refere ao efeito dos compostos voláteis do óleo essencial de *T. minuta* sobre o desenvolvimento dos escleródios, especificamente do patógeno *S. sclerotiorum*, agregam-se mais pressupostos que valoram a possível eficiência do óleo essencial para o manejo do controle da doença. Segundo Venturoso et al. (2014), escleródios com menor massa apresentam menor germinação carpogênica, a qual caracteriza-se como importante fonte de dissiminação da doença no campo. Nesse

contexto, Marques (2014), ao avaliar o óleo essencial de folhas de *Eugenia uniflora* sobre escleródios de *S. sclerotiorum*, 15 dias após o tratamento, via contato, em laboratório, observou que nas concentrações de 10, 250 e 500ppm houve aumento do número de escleródios, no entanto de menor peso, e a germinação dos escleródios demonstraram reduções nas velocidades dos crescimentos miceliais, sendo que com 1500ppm não houve formação das estruturas. Freddo (2015), da mesma forma, observou redução na velocidade de germinação de escleródios de *S. sclerotiorum* ao utilizar, via contato, in vitro, o óleo essencial de *Aloysia citriodora*, atingindo 100% de inibição da germinação na concentração de 0,25%. Alterações em hifas e escleródios de *S. sclerotiorum*, após tratamento com óleo essencial, também foram verificadas por Ma et al. (2015), após utilizarem 0,5 e 1 μ L do óleo essencial de sementes de *A. graveolens*, via contato, in vitro, obtiveram hifas enrugadas e colapsadas, além de, na concentração de 1 μ L mL⁻¹, rompimento e perda da integridade nas células globulares da estrutura externa dos escleródios e deformação nas da parte interior. Ademais, Soyulu et al. (2007), verificaram que a utilização dos óleos essenciais de *O. syriacum* e *F. vulgare*, via volátil e contato, in vitro, ocasionaram mudanças na morfologia de hifas e escleródios, sendo as hifas de formas e tamanhos diferentes, além de degradadas, com a presença de grandes vesículas dentro das paredes celulares, murchas, sem a presença de citoplasma e/ou com citoplasma vazio, sem organelas e os escleródios com a superfície enrugada e ressecada, com encolhimento e lise das células internas.

Dessa forma, a utilização do óleo essencial de *T. minuta*, pode ser de grande valia para o manejo de fitopatógenos, principalmente, no que tange o tratamento fitossanitário de materiais vegetais de propagação, que normalmente são armazenados em ambientes controlados e por tempos determinados, atuando tanto na inibição total do patógeno, quando na redução da fonte de inóculo primário.

Ao encontro dessa possibilidade, outros trabalhos vêm logrando êxito no tratamento de materiais vegetais com voláteis de óleos essenciais, focando o aspecto sanitário sobre fitopatogenos. Sharma e Tripathi (2008) chegaram a resultados promissores ao utilizarem o volátil do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* em conjunto com água quente e UV-C sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *gladioli* no tratamento de cormos de *Gladiolus* spp. Sendo que, ao utilizarem o tratamento com óleo essencial não observaram efeito dos voláteis sobre a morte de cormos. Também, Lorini et al. (2016), visando o tratamento pós-colheita de castanhas-do-brasil (*Bertholletia excelsa*) frente aos fitopatógenos *A. niger*, *A. flavus*, *Rhizopus* sp. e *Penicillium* sp.,

concluíram que os compostos voláteis dos óleos essenciais de *S. aromaticum*, *Cinnamomum cassia* e *Corymbia citriodora* inibiram o desenvolvimento dos fungos. Ademais, Tripathi e Kumar (2007), ao utilizarem 32 espécies de plantas para verificarem a ação dos compostos voláteis de seus óleos essenciais sobre a microflora associada a sementes de amendoim (*Arachis hypogea*) evidenciaram eficiência de 100% dos compostos voláteis do óleo essencial de *Putranjiva roxburghii* sobre *A. flavus* e *A. niger*, protegendo as sementes por um período de seis meses, sem ocasionar danos na germinação e no crescimento e morfologia das plântulas.

Contudo, levando-se em consideração a expressividade do elemento volume do óleo essencial de *T. minuta* sobre a TIC de *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, muito embora o tempo de exposição também tenha mostrado-se como elemento de grande valia, principalmente, na contenção de crescimento dos patógenos e no desenvolvimento, esse em específico para *S. sclerotiorum*, conjunturou-se elementos para a elaboração da próxima etapa do trabalho.

4.3 Efeito de voláteis de óleo essencial de *T. minuta* sobre patógenos de sementes

4.3.1 Sementes de feijão inoculadas com *S. sclerotiorum*

A análise de componentes principais (ACP) de variáveis de crescimento e fitossanitárias de sementes de feijão da cv. BRS Expedito infectadas com *S. sclerotiorum* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *T. minuta* apresentou 76,7% de explicação das variações observadas nos diferentes tratamentos, sendo 42,7% no CP 1 e 34,0% no CP 2 (Figura 11). Nas sementes de Carioca a explicação total foi de 66,0%, sendo 45,0% no CP 1 e 21,0% no CP 2 (Figura 11). O detalhamento da ACP e a matriz de correlação das variáveis estão nos Anexos E e F.

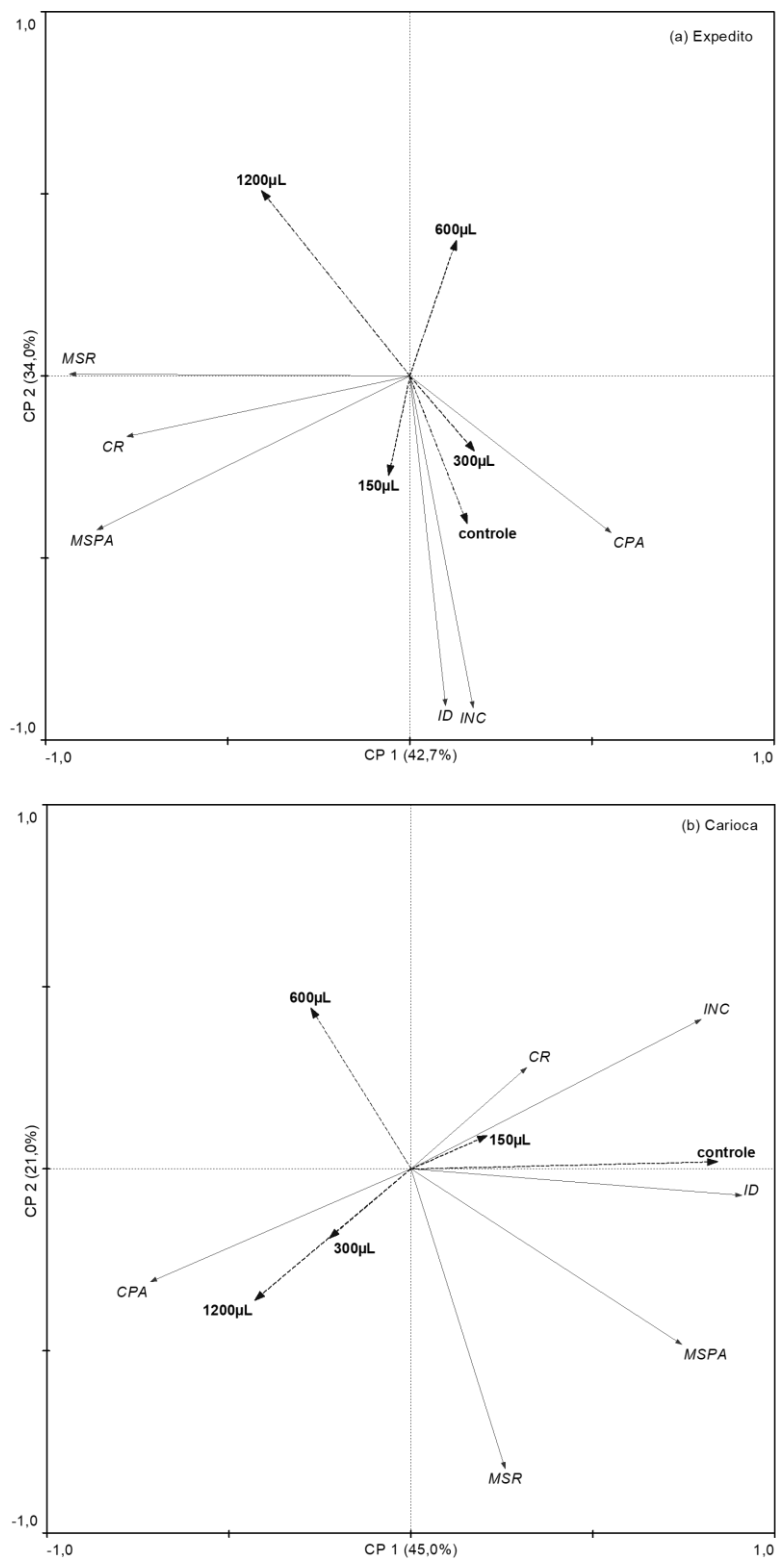


Figura 11 – Análise componentes principais (CP) de variáveis de crescimento e fitossanitárias de sementes de feijão cv. BRS Expedito (a) e Carioca (b) infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta*. CPA, comprimento de parte aérea; CR, comprimento de raiz; MSPA, massa seca de parte aérea; MSR, massa seca de raiz; INC, incidência de doença; ID, índice de doença. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

A incidência de doença (INC) e o índice de doença (ID) foram fortemente correlacionadas entre si, tanto nas sementes inoculadas da cv. BRS Expedito ($r = 0,86$; $p = 1,27e^{-09}$) quanto para Carioca ($r = 0,89$; $p = 1,86e^{-10}$), indicando que os tratamentos mais afetados também foram os que ocorreram maior severidade da doença (Figura 11 e Anexo F).

As sementes inoculadas dos tratamentos controle, ou seja, aquelas que não foram expostas aos voláteis do óleo essencial de *T. minuta*, tiveram correlação positiva com a INC e o ID, além de correlação negativa com o comprimento e massa seca de raiz na cv. BRS Expedito e com o comprimento de parte aérea para Carioca (Figura 11). Por sua vez, o aumento do volume de óleo essencial, sobretudo no volume de 1200 μ L, em ambas sementes, apresentou correlação negativa com a ocorrência e a severidade do patógeno (Figura 11). Na cv. BRS Expedito a correlação entre volume e INC e ID foi $r = -0,78$ ($p = 3,78e^{-07}$) e $r = -0,67$ ($p = 4,80e^{-05}$), respectivamente, e em Carioca foi de $r = -0,67$ ($p = 9,84e^{-05}$) e $r = -0,51$ ($p = 0,0052$) (Anexo F).

Em geral, o efeito do óleo essencial foi não significativo ou foi pouco significativo sobre as variáveis de crescimento das plântulas de feijão e, quando nesse último caso, apresentou valores de correlação ao redor de 0,50 (Anexo F). Esse fato, aponta a tendência do óleo essencial de *T. minuta* possuir alto potencial de controle do patógeno *S. sclerotiorum* e, ao mesmo tempo, pouco efeito sobre a qualidade fisiológica das sementes de feijão. Essa não interferência sobre o desenvolvimento inicial das plântulas, também pôde ser verificada, quando as sementes foram tratadas com o óleo essencial sem a inoculação do patógeno (Anexo F).

A partir dos resultados, foi possível construir equações de regressão para a resposta da TIN e da TID, para cv. BRS Expedito e Carioca, em função do volume de óleo essencial de *T. minuta* (Tabela 14 e Figura 12). De forma geral, a medida em que as sementes de feijão foram expostas aos maiores volumes de óleo essencial, houve redução na TIN e na TID das plântulas de feijão. Para a cv. BRS Expedito, as curvas de regressão apresentaram todos os parâmetros significativos (p -valor) e qualidade do ajuste ($pseudoR^2$) superior a 90%, indicando que os modelos possuem elevado ajuste de predição volume-resposta. Contudo, para Carioca, não foi possível ajustar uma equação para o comportamento volume-resposta da TID, enquanto que, para a TIN a qualidade do ajuste foi superior à 95% (Tabela 14).

Tabela 14 – Parâmetros estatísticos das curvas de regressão utilizando a distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de incidência de doença (TIN) e para a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito e Carioca infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial (OE) de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável	Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	<i>pseudoR</i> ²	AIC		
cv. BRS Expedito	TIN	Logaritmo	Int	-0,1267	0,0439	$3,86e^{-03}$	0,9332	-8,3511
			$V_{\mu L}$	-0,0013	0,0002	$2,26e^{-13}$		
	TID	Logaritmo	Int	-0,1561	0,0220	$1,27e^{-12}$	0,9635	-15,0416
			$V_{\mu L}$	-0,0005	0,0001	$3,69e^{-18}$		
cv. Carioca	TIN	Logaritmo	Int	-0,2258	0,0894	$1,15e^{-02}$	0,9560	-6,4067
			$V_{\mu L}$	-0,0039	0,0006	$2,62e^{-10}$		
	TID	Logaritmo	Int	-0,5103	0,2456	0,0377	0,3971	1,5548
			$V_{\mu L}$	-0,0017	0,0007	0,0205		

Legenda: Int, intercepto; $V_{\mu L}$, volume de óleo essencial em μL ; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

Através do modelo ajustado para a TIN nas plantas de feijão da cv. BRS Expedito, pôde-se verificar que a presença da doença causada pelo patógeno *S. sclerotiorum* reduziu em torno de 17,91, 32,61, 54,58 e 79,37% com os volumes de 150, 300, 600 e 1200 μ L, respectivamente. Já, para a severidade da doença, representada pela TID, a redução foi ao redor de 7,19, 13,87, 25,81 e 44,96%, na mesma sequência de volumes já mencionados (Tabela 14 e Figura 12A). No entanto, para Carioca, a redução da incidência da doença mostrou-se mais efetiva, pois as quedas foram próximas a 44,07, 68,72, 90,22 e 99,04% com os volumes de 150, 300, 600 e 1200 μ L (Tabela 14 e Figura 12B). Podendo isso, estar relacionado com a TIN inicial, que nas plântulas da cv. BRS Expedito foi de 88,10% e nas da Carioca 79,78% (Tabela 14 e Figura 12). Justificando-se, essa diferença, possivelmente devido a variabilidade genética entre as duas sementes utilizadas, visto que as sementes da cv. BRS Expedito caracterizam-se por apresentarem um padrão genético, ao passo que as sementes de Carioca, por tratarem-se de uma população, possuem maior variabilidade.

A ação deletéria da fase volátil do óleo essencial de *T. minuta* sob *S. sclerotiorum*, através do tratamento de sementes (Figura 11 e Tabela 14), assim como já vêm sendo atestado ao longo dos resultados obtidos nos testes in vitro sobre o patógeno no trabalho, nos itens 4.1 e 4.2, sustentam, ainda mais, a eficiência e a possibilidade concreta de uso desse composto com a finalidade de tratar materiais vegetais de propagação. Atuando sobre o patógeno, na forma de micélio, que pode estar associado ao tegumento e as estruturas internas das sementes (MACHADO, 1988). Reduzindo a fonte de inóculo inicial e de dissiminação, além de aumentar o potencial produtivo das plantas nos campos de produção, visto que quanto maior o potencial de inóculo inicial das sementes, menor a capacidade germinativa das sementes, do índice de velocidade de emergência e a massa seca de parte aérea e raiz das plântulas de feijão (BOTELHO et al., 2013; MIGLIORINI et al., 2016), corroborando com algumas das variáveis observadas no tratamento controle com inóculo (Figura 11).

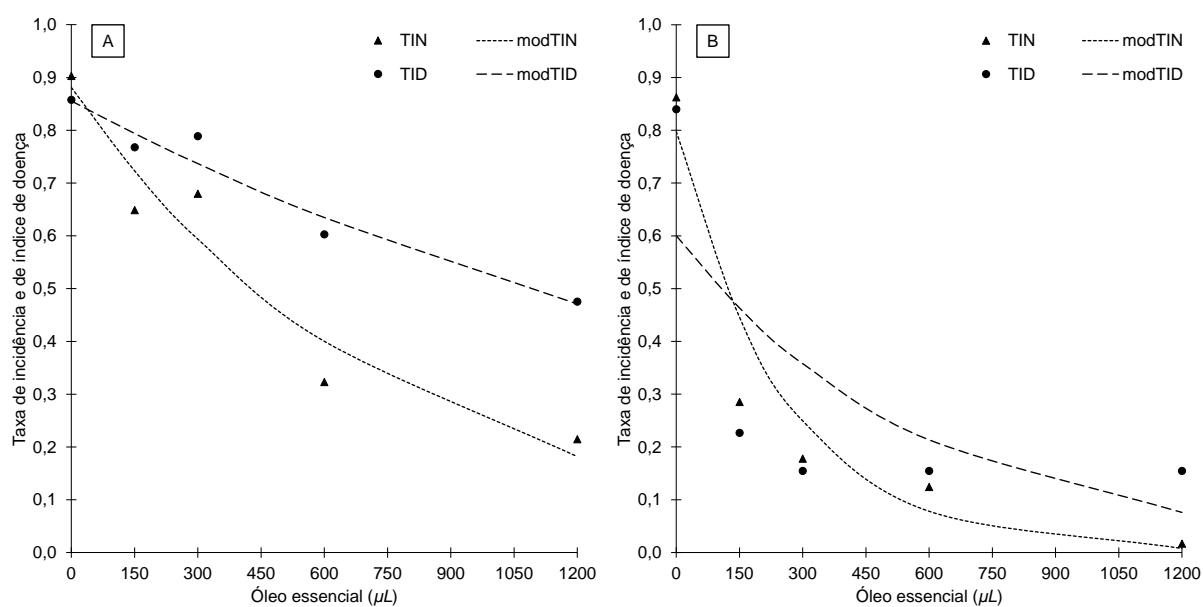


Figura 12 – Relação volume-resposta para a taxa de incidência de doença (TIN) e a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito [A] e Carioca [B] infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Dessa forma, cabe ressaltar que, para *S. sclerotiorum*, patógeno considerado praga quarentenária não regulamentada (presentes no país com potencial de oferecer riscos) em sementes de feijão, soja e girassol, a tolerância é zero para o número de escleródios. No entanto, nenhuma menção é dada a infecção de sementes via micélio, importante e potencial fonte de inóculo da doença, muito embora trabalhos na literatura venham demonstrando a sua importância (HENNING, 2005; BOTELHO et al., 2013; VENTUROSOSO et al., 2015).

No que tange o uso de óleos essenciais para o manejo de *S. sclerotiorum* no feijão, algumas experiências também vêm apresentando-se auspiciosas, a exemplo de Al-Taisan et al. (2014), no Egito, que ao utilizarem os óleos essenciais de casca de *C. zeylanicum*, folhas de *Mentha* spp. e de sementes de *S. aromaticum*, via encharcamento de substrato, na concentração de 10ppm, previamente inoculado com *S. sclerotiorum*, verificaram, 60 dias após a semeadura das sementes de feijão da cv. Naz, 20% a mais de sobrevivência das plantas em que o solo foi tratado com o óleo de casca de *C. zeylanicum* e 5% a mais quando com os óleos de folhas de *Mentha* spp. e de sementes de *S. aromaticum*. Já, Marques (2014), no Brasil, ao avaliar o óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, em feijão da cv. BRS Pérola, para o controle de *S. sclerotiorum*, verificou ao aplicar o óleo essencial via pulverização em folhas destacadas, que não houve lesão ao utilizar 500 μ L por folha das concentrações de 25, 50, 100 e 200ppm, sendo que, em plantas, na casa de vegetação, a área da lesão provocada pela doença foi inferior à da testemunha com a aplicação de 500 μ L por folha da concentração de 200ppm. Ademais, o óleo essencial induziu mecanismos de respostas na planta de feijão, visto que houve aumento das proteínas relacionadas a defesa, como quitinases, β -1,3-glucanase, PAL, peroxidases e polifenosidases.

Em princípio, pouco ou nenhum foram os efeitos negativos provocados pelos voláteis do óleo essencial de *T. minuta* sobre as sementes de feijão, assim como observado por Olanda (2014) ao tratar sementes de feijão da cv. Carioca com tintura da planta nas concentrações de 0,5, 1 e 2%, visando o controle de *C. lindemuthianum*. A autora, ao analisar o efeito curativo e protetor das tinturas com e sem álcool, via contato, verificou que nas tinturas sem álcool não houve efeito fitotóxico sobre o desenvolvimento das plântulas de feijão, no entanto nas tinturas com álcool na maior concentração houve menor comprimento de parte aérea e raiz, ao passo que, na menor, maior comprimento dessas variáveis. Medeiros et al. (2013), ao avaliarem diferentes concentrações do óleo essencial de *T. minuta* em sementes de alface,

utilizando umidecimento do substrato com o óleo essencial, concluíram que em concentrações baixas não houve interferência do tratamento sobre a qualidade fisiológica das sementes, mas nas altas observaram perda na germinação e no vigor. A relação de dose-efeito, observada por Masangwa et al. (2017) em sementes de feijão e feijão-caupi (*Vigna unguiculata*) tratadas com extratos de plantas, via embebição, evidenciam em altas concentrações a redução de germinação e de velocidade de emergência, mas em concentrações adequadas, apresenta benefícios na germinação, dado pelo desenvolvimento, nas raízes embrionárias, de vacúolos, cristais nas mitocôndrias, menor quantidade de lipídios e corpos proteicos, que estão relacionados com a aceleração do metabolismo, além de eficiência sobre *C. lindemuthianum* e *Colletotrichum dematium*.

A utilização do tratamento de sementes com o óleo essencial de *T. minuta*, possivelmente pode ser utilizado em outras espécies, visando o controle de *S. sclerotiorum*, visto que este fungo é polífago, associado às sementes de várias espécies, tais como algodão, soja, girassol, canola (*B. napus* var. *oleifera*), cártamo (*Carthamus tinctorius*), crambe (*Crambe abssynica*), nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleiferus*) e níger (*Guizotia abyssinica*), além de alface, brássicas, outras fabáceas como o feijão (HENNING, 2005; PEREIRA et al., 2015; VENTUROSOSO et al., 2015) e entre outras.

No entanto, estudos relacionados à interação existente entre volátil e espécie de material propagativo são necessários, afim de esclarecer possíveis efeitos fitotóxicos sobre as sementes, conforme já mencionado anteriormente. Nesse contexto, Pansera et al. (2012), no Brasil, ao avaliarem os óleos essenciais de *C. citratus*, *Schinus molle* L., *S. terebinthifolius*, *Salvia officinalis* L. e *Bacharis trimera* (Less.) DC., nas concentrações de 0,15 e 0,20%, em plantas de alface, previamente transplantadas em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, após pulverizações semanais por um período de 30 dias, observaram que a incidência da doença foi reduzida em 80% quando utilizados os óleos essenciais de *S. officinalis* e *B. trimera* e em 93,4% quando utilizado o de *C. citratus*. Os óleos essenciais de *S. officinalis* e de *C. citratus* alteraram a morfologia da colônia fúngica e inibiram a formação de escleródios. De forma semelhante, Ma et al. (2015), na China, verificaram que o óleo essencial de sementes de *A. graveolens* L. visando o controle de *S. sclerotiorum*, em canola, demonstrou resultados relevantes, pois tanto na avaliação em folhas destacadas no laboratório, quanto em plantas na casa de vegetação, houve redução

da doença, após a pulverização de 5mL dos tratamentos por folha. Na primeira avaliação, a lesão ocasionada nas folhas foi suprimida na concentração de $0,50\mu\text{L mL}^{-1}$ de óleo essencial, quando o tratamento foi realizado 12h antes do inóculo, ao passo que, ao ser realizado 12h após, a lesão apresentou o tamanho mínimo de 8,67mm com a concentração de $1,00\mu\text{L mL}^{-1}$. Já, em relação às plantas na casa de vegetação, a inibição de *S. sclerotiorum* foi de 100% na concentração de $10\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial.

Outras experiências relacionadas ao uso de óleos essenciais sobre *S. sclerotiorum* também têm mostrado resultados relevantes na sanidade de plantas, muito embora suas sementes não se comportem como transmissores da doença, a exemplo de solanáceas e curcubitáceas (PEREIRA et al., 2015). Desse modo, Freddo (2015), no Brasil, ao avaliar plantas de pepino após o tratamento de sementes com o óleo essencial de *A. citriodora* pelo contato, utilizando 10mL para cada 100 sementes das concentrações de 0,06, 0,12 e 0,25%, semeadas em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*, verificaram redução no tombamento das plantas na concentração de 0,06%, mas resultados iguais ao da testemunha nas maiores concentrações, devido ao efeito fitotóxico ocasionado pelo óleo essencial sobre as plantas. No entanto, o autor também evidenciou, o aumento da atividade das enzimas peroxidase e β -1,3-glucanases, envolvidas nos mecanismos de defesa vegetal. Por outro lado, Soyulu et al. (2007), na Turquia, verificaram não haver efeito negativo dos óleos essenciais de *O. syriacum* e *F. vulgare* em plantas de tomate em que as sementes foram alocadas em substrato previamente tratado, além de aumento, na mesma sequência de tratamento, de 26,7 e 43,2% na sobrevivência de plantas em substrato inoculado com *S. sclerotiorum*.

Ademais, o comportamento das sementes mostrou-se diferenciado, no que se refere a quantidade de óleo essencial para a redução da doença, pois de maneira geral, houve maior necessidade de se utilizar volumes mais elevados de óleo essencial nas sementes da cv. BRS Expedito do que nas de Carioca, conforme o ajuste dos dados ao modelo de regressão (Tabela 14 e Figura 12). Isso, indica que as interações existentes entre semente-patógeno-óleo essencial são diferentes entre si, visto que tanto entre sementes, quanto entre patógenos, de uma mesma espécie, há variabilidade genética (ANTUNES et al., 2010; PORCH et al., 2014), assim como há variabilidade na composição de óleos essenciais (GOMES, 2017), conferindo isso, uma série de interações entre esses elementos. Essa resposta diferenciada entre

cultivares de uma mesma espécie também foi observada por Moura et al. (2017), que ao tratarem sementes de feijão das variedades crioulas Mourinho e Rajado Vermelho com óleo essencial de *E. uniflora* pelo método de imersão por um período de cinco minutos, verificaram comportamentos diferenciados nas avaliações sanitária e fisiológica das sementes. Dessa forma, reafirma-se a importância das pesquisas em considerarem essas interações, assim como na recomendação prática do tratamento de sementes com óleos essenciais, de modo que, possam agir de maneira eficiente sobre fitopatógenos, mas sem comprometer o desenvolvimento de plântulas.

4.3.2 Sementes de feijão inoculadas com *M. phaseolina*

A análise de componentes principais (ACP) de variáveis de crescimento e fitossanitárias de sementes de feijão cv. BRS Expedito infectadas com *M. phaseolina*, submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *T. minuta*, apresentou 73,6% de explicação das variações observadas nos tratamentos, sendo 41,7% no CP 1 e 31,4% no CP 2 (Figura 13A). Para Carioca, a explicação total foi de 58,3%, sendo 33,6% no CP 1 e 24,7% no CP 2 (Figura 13B). O detalhamento da ACP e a matriz de correlação das variáveis estão nos anexos G e H.

A incidência de doença (INC) e o índice de doença (ID) foram fortemente correlacionadas entre si, tanto nas sementes inoculadas da cv. BRS Expedito ($r = 0,92$; $p = 6,23e^{-13}$) quanto para Carioca ($r = 0,76$; $p = 1,22e^{-06}$), muito embora em menor grau, indicando que os tratamentos mais afetados também foram aqueles em que ocorreu maior severidade da doença (Figura 13A).

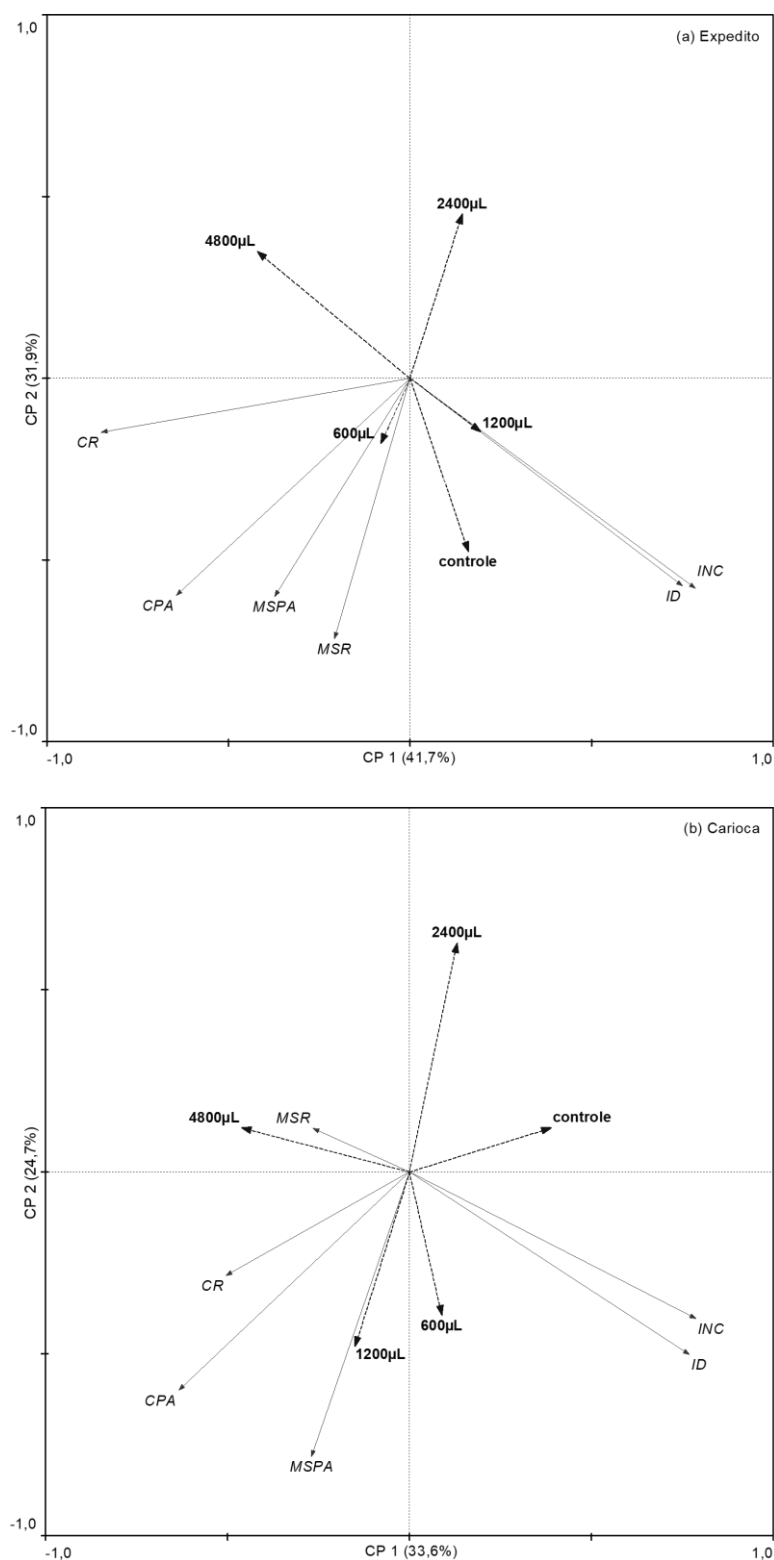


Figura 13 – Análise componentes principais (CP) de variáveis de crescimento e fitossanitárias de sementes de feijão cv. BRS Exedito (a) e Carioca (b) infectadas com *Macrophomina phaseolina* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta*. CPA, comprimento de parte aérea; CR, comprimento de raiz; MSPA, massa seca de parte aérea; MSR, massa seca de raiz; INC, incidência de doença; ID, índice de doença. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

No tratamento controle com inóculo, em que as sementes inoculadas com *M. phaseolina* não foram expostas aos voláteis do óleo essencial de *T. minuta*, em ambas sementes, houve correlação positiva com a INC e o ID, além de correlação negativa com o comprimento de raiz na cv. Exedito e no comprimento e massa seca de parte aérea e raiz para Carioca (Figura 13B). Da mesma forma, essa ação foi observada nos tratamentos com os volumes de 600 μ L e 1200 μ L, indicando uma fraca ação dos voláteis sobre o patógeno. Por sua vez, o volume de 2400 μ L apresentou uma correlação quase neutra sobre o patógeno, enquanto o volume de 4800 μ L demonstrou clara correlação negativa com a INC e o ID. Na cv. BRS Exedito a correlação entre volume e INC e ID foi $r = -0,57$ ($p = 0,0010$) e $r = -0,55$ ($p = 0,0017$), respectivamente, e em Carioca foi de $r = -0,52$ ($p = 0,0033$) e $r = -0,48$ ($p = 0,0075$) na mesma sequência.

O maior volume testado, 4800 μ L, aparentemente não afetou ou afetou pouco as variáveis de crescimento na cv. BRS Exedito e Carioca. Contudo, é possível verificar que no volume 2400 μ L, onde os voláteis do óleo essencial não foram muito efetivos sobre o patógeno, o crescimento e a massa seca da parte aérea e das raízes, de forma geral, foi negativamente afetado. Podendo este fato, indicar a somatização do tratamento com óleo essencial e da presença do patógeno, visto que nos baixos volumes (600 e 1200 μ L) o efeito do óleo foi insignificante sobre as sementes e sobre o patógeno, atuando logo, somente o fungo sobre a qualidade das sementes. Já, no volume de 2400 μ L, o maior volume de óleo essencial somado com a presença do patógeno, aumentaram a ação negativa sobre as sementes, ao passo que, no maior volume, a ação do patógeno foi excluída, diminuindo esse efeito.

A partir dos resultados, foi possível construir equações de regressão para a resposta da TIN e da TID, para cada cultivar de feijão, em função do volume de óleo essencial de *T. minuta* (Tabela 15 e Figura 14). Elas apresentaram um comportamento volume-dependente, demonstrando que quanto maior o volume de óleo essencial aplicado nas sementes via volatilização, menor a TIN e a TID. Sendo que, cada cultivar teve uma resposta específica na redução do patógeno em função do volume utilizado.

Tabela 15 – Parâmetros estatísticos das curvas de regressão utilizando a distribuição Beta e respectivas funções de ligação para a taxa de incidência de doença (TIN) e para a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. BRS Expedito e Carioca infectadas com *Macrophomina phaseolina* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial (OE) de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável	Função de ligação	Coeficientes	dp	p-valor	pseudoR ²	AIC
cv. BRS Expedito	TIN	Int	0,9507	0,2085	$5,13e^{-06}$	0,8888
		$V_{\mu L}$	-0,0005	0,0001	$3,93e^{-06}$	
	TID	Int	1,0723	0,1831	$4,75e^{-09}$	0,7785
		$V_{\mu L}$	-0,0003	0,0001	$3,48e^{-05}$	
Carioca	TIN	Int	0,7387	0,1828	$5,33e^{-05}$	0,9762
		$V_{\mu L}$	-0,0010	0,0001	$1,84e^{-14}$	
	TID	Int	-0,3221	0,0679	$2,10e^{-06}$	0,8742
		$V_{\mu L}$	-0,0002	$4,20e^{-05}$	$7,71e^{-05}$	

Legenda: Int, intercepto; $V_{\mu L}$, volume de óleo essencial em μL ; dp, desvio padrão; AIC, critério de informação de Akaike.

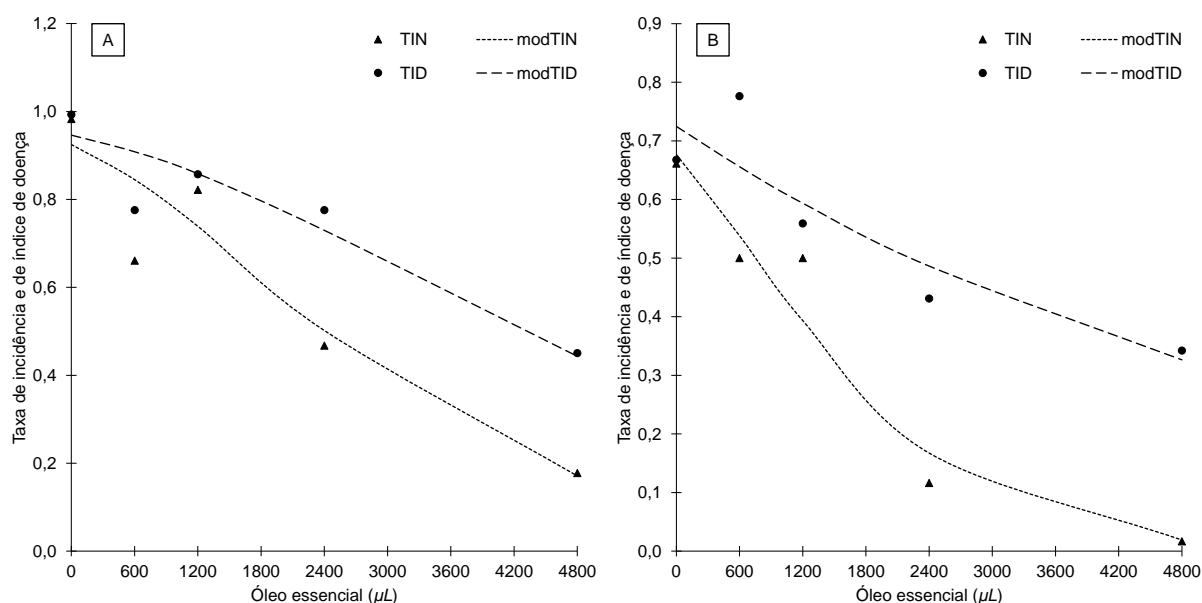


Figura 14 – Relação volume-resposta para a taxa de incidência de doença (TIN) e a taxa de índice de doença (TID) em sementes de feijão cv. Expedito [A] e Carioca [B] infectadas com *Macrophomina phaseolina* submetidas aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Dessa forma, as plantas da cv. BRS Expedito, que tiveram as suas sementes tratadas no menor volume de avaliação, ou seja, 600 μ L, apresentaram reduções na TIN em torno de 8,63% e na TID ao redor de 3,99%, passando, na mesma sequência, para valores próximos a 20,10 e 9,27% no volume de 1200 μ L, assim como, 45,73 e 22,88% no volume de 2400 μ L e chegando a 81,50 e 53,16% no volume de 4800 μ L (Tabela 15 e Figura 14A).

Para Carioca, as reduções nas TIN e TID foram maiores em comparação com as observadas na cv. BRS Expedito, visto que, com o volume de 600 μ L, a TIN foi em torno de 20,48% e a TID em torno de 9,48%, sendo que, nos volumes de 1200 μ L e 2400, 4800 μ L esses valores passaram a próximos de 41,86, 75,27 e 97,20% na TIN e 18,07, 32,88 e 54,94% na TID, respectivamente (Tabela 15 e Figura 14B). Sendo que, essa ação, possivelmente, deve estar relacionada com a menor incidência e severidade da doença apresentada pelo controle nas plântulas de Carioca, as quais foram em torno de 67,67 e 72,47%, respectivamente, ao passo que, na cv. BRS Expedito foram ao redor de 92,48 e 94,62%, na mesma sequência. Sendo, essa diferença, possivelmente, devido a variabilidade genética apresentada entre os materiais de propagação, conforme já mencionado anteriormente no item 4.3.1.

Assim, como já observado para *S. sclerotiorum*, no item 4.3.1, o tratamento de sementes de feijão com os compostos voláteis do óleo essencial de *T. minuta*, também se mostra promissor para o controle de *M. phaseolina*, como vêm sendo atestado ao longo do estudo nos itens 4.1 e 4.2. Promovendo, devido a menor fonte de inóculo, no caso do maior volume de tratamento (4800 μ L), aumento do potencial de desenvolvimento das sementes, conforme a correlação positiva entre as variáveis de comprimento e massa seca de parte aérea e raiz, em ambas sementes estudadas, muito embora para Carioca a correlação tenha se dado com maior expressividade (Figura 13). Visto que, sementes de feijão da cv. Expedito inoculadas com o patógeno pelo método de contato, próximo ao método utilizado nesse trabalho, porém com restrição hídrica, apresentaram menor germinação, comprimento de parte aérea e massa seca (SILVA et al., 2016).

Fomentando esses resultados, trabalhos na literatura vêm apostando na possibilidade de uso de óleos essenciais para o tratamento de sementes de feijão visando o controle de *M. phaseolina*, a exemplo de García et al. (2008), em Cuba, que ao avaliarem sementes de feijão contaminadas naturalmente com *M. phaseolina*, após tratamento, via contato, com o óleo essencial de *Cymbopogon nards*, verificaram

redução de 100% na incidência do patógeno na concentração de 25% do óleo essencial, além de ação sobre os fungos *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Também, Khaledi et al. (2014), em casa de vegetação no Irã, obtiveram resultados satisfatórios, ao utilizarem o óleo essencial de *M. piperita* e o seu constituinte majoritário, mentol, tanto no tratamento de sementes de feijão da cv. Naz, quanto na aplicação foliar, sendo que a redução da severidade da doença ocasionada por *M. phaseolina*, em ambas as formas de tratamento, mostrou-se dose-dependente, assim como observado nesse trabalho, conforme já demonstrado pelas equações de regressão (Tabela 12 e Figura 14), e também não verificaram efeitos fitotóxicos dos tratamentos sobre as plantas. Esses autores, na maior dose testada do óleo essencial, 450ppm, chegaram a supressões de 5,4% ao tratarem as sementes e 72,6% quando trataram as plantas. Com o constituinte majoritário, esses valores aumentaram para 38,9 e 90,8%, respectivamente. Ademais, observaram reduções de 40,5 e 45,1% de *R. solani* ao tratarem as sementes e 68,3 e 74,6% ao tratarem as plantas, com o óleo essencial e o composto majoritário, respectivamente.

Outros autores vêm realizando o uso combinado de produtos provenientes de plantas com agentes de biocontrole e agrotóxicos químicos sintéticos, na tentativa de encontrar resultados mais efetivos sobre *M. phaseolina* e com menor efeito contaminante sobre o ambiente, além de maior independência dos agricultores, no que se refere aos agrotóxicos químicos sintéticos. Kumar et al. (2011), na Índia, ao utilizarem extrato aquoso de folhas frescas de nim (*Azadirachta indica*), Bavistin (active ingredient carbedazim 50 WP) e *Trichoderma harzianum* no tratamento de sementes de pinhão-manso (*Jatropha curcas*), alocadas em substrato previamente inoculado com *M. phaseolina*, chegaram a efeitos promissores no uso do extrato e do agente de biocontrole, utilizados de forma isolada e em conjunto, atingindo valores muito próximos aos obtidos com o agrotóxico químico sintético ou deste em associação. Todos, com eficiência em comparação com a testemunha, com maiores valores de germinação, menor porcentagem de mortalidade na pré e pós-emergência e maior redução da doença em plantas. Já, Mena-Rodríguez et al. (2018), na Colômbia, ao tratar plantas de feijão, pimentão (*Capsicum annuum*) e berinjela (*Solanum melongena*), visando o manejo de *M. phaseolina*, *Phytophthora capsici* e *C. gloeosporioides*, com os óleos essenciais de *Lippia alba* e *C. citratus*, além de tiabendazol, isolados e em associação, verificaram aumentos na produtividade e redução de doenças com todos os tratamentos. Chegando a acréscimos na

produtividade do feijão de 13,95 e 46,5%, no pimentão de 23,25 e 12,32% e na berinjela de 12,10 e 14,65% com os tratamentos realizados com *L. alba* e *C. citratus*, respectivamente. Além de menor incidência de doenças, na mesma sequência de tratamento mencionada anteriormente, de 0,9 e 1,1% no feijão e de 38 e 51% no pimentão, sendo que para berinjela não houveram diferenças.

No que se refere ao possível efeito deletério dos voláteis do óleo essencial de *T. minuta* sobre a qualidade fisiológica das sementes, em volumes maiores de tratamento aos utilizados para *S. sclerotiorum*, conforme observado no item 4.3.1, não necessariamente deve ser compreendida como fator limitante, a fim de invalidar a utilização do composto, pois mesmo que haja um estresse nas fases iniciais, isso não significa que a planta não terá condições de se reestabelecer (INOUYE, 2003b), visto que estará em melhores condições sanitárias. Porém, essa relação custo-benefício é um dos elementos que carecem de mais investigações. Na literatura, vários trabalhos apontam os efeitos negativos de *T. minuta* sobre a qualidade de sementes, inclusive propondo o uso da planta como bioherbicida (BATISH et al., 2007). Doravante, assim como já discutido anteriormente, no item 4.3.1, o efeito fitotóxico está relacionado com o volume de uso.

Contribuindo com essa discussão, Inouye (2003b), ao tratar sementes e plântulas de feijão com os voláteis de diferentes óleos essenciais, verificou comportamentos fisiológicos variados. Ao avaliar o desenvolvimento de sementes por uma semana, em condição hermética, a temperatura ambiente e em exposição aos compostos voláteis de óleos essenciais, observou efeitos negativos no alongamento de radículas e hipocótilos, mostrando-se dose-dependente com os tratamentos entre 0,1 e 10mg L⁻¹ de ar, com os óleos essenciais de *Lavandula angustifolia*, *Camellia sinensis*, *Perilla frutescens* e *T. vulgaris*, sendo que após a exposição, as plantas tratadas com os dois últimos demonstraram reabilitação, ao passo que, o óleo essencial de *Citrus medica* não mostrou efeito algum. Ademais, ao testarem, na mesma condição anterior, plantas grandes, verificaram o mesmo comportamento para o óleo essencial de *C. medica*, baixo efeito fitotóxico com o de *L. angustifolia* na maior dose e murchamento das plantas com o de *T. vulgaris*. Segundo o autor, esses efeitos estão relacionados com a toxidez ocasionada por compostos dos óleos essenciais que, ao não serem metabolizados, acumulam-se nos tecidos. Dessa forma, se forem absorvidos quando o metabolismo for anabólico, ou seja, no início do processo de germinação, quando há consumo de energia e não forem degradados, haverá

fitotoxidez. Por outro lado, se forem metabolizados, ao passarem para um metabolismo catabólico, haverá condições de se reestabelecer.

Esse fato, no que tange aos efeitos de doses sobre a resposta fisiológica das sementes, também alude ao fato de que os volumes utilizados no trabalho, para a redução da doença provocada por *M. phaseolina*, assim como para *S. sclerotiorum*, no item 4.3.1, possam reduzir-se, no caso do uso de tecnologias de aplicação mais adequadas, as quais possam promover o aumento da eficiência do uso dos óleos essenciais. Dessa forma, o uso do óleo essencial puro, via volatilização, conforme utilizado no trabalho, carece de novas investigações, principalmente, sobre a relação existente entre volume de sementes, volume de óleos essenciais, temperatura e tempo de tratamento, que inclusive, possam condizer com o armazenamento. Nessa perspectiva, trabalhos como de Girardi et al. (2017), que visa encapsular o óleo essencial afim de evitar perdas e degradação, mostra-se como uma tecnologia potencial, visto que, ao tratarem sementes de amendoim com o óleo essencial de *Lippia turbinata* encapsulado com gelatina e goma arábica, durante armazenamento, mantiveram a ação antifúngica do óleo essencial, reduzindo a microflora natural das sementes, apesar de detectarem efeitos negativos sobre a germinação. Esse fato reforça a importância de estudos nesse campo.

Em consonância com o observado no comportamento das sementes de feijão, após o tratamento com o óleo essencial visando o controle de *S. sclerotiorum*, no item 4.3.1, para *M. phaseolina*, mesmo em volumes mais elevados, a tendência mostrou-se igual, ou seja, a cv. BRS Expedito demandou maiores volumes de óleo essencial no tratamento das sementes do que Carioca para alcançar valores iguais de inibição do patógeno, conforme pode-se observar nos dados demonstrados anteriormente (Tabela 15 e Figura 14).

5 Conclusão

Os voláteis do óleo essencial de *T. minuta* promoveram significativa inibição do crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* em condições in vitro.

Em 72 horas de exposição aos compostos voláteis do óleo essencial de *T. minuta*, in vitro, *S. sclerotiorum* teve total inibição do crescimento micelial com o volume de 10 μ L e *M. phaseolina* com 75 μ L.

O óleo essencial de *T. minuta*, via volatilização, in vitro, mostrou-se volume-dependente e tempo-dependente na inibição de crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* e na redução do número e massa de escleródios de *S. sclerotiorum*.

No volume de 25 μ L, a qualquer tempo de exposição, o óleo essencial de *T. minuta* foi eficiente sobre *S. sclerotiorum*, in vitro, não se fazendo necessários tempos de exposição superiores a 24h para o controle.

Em volumes inferiores a 25 μ L o tempo mostrou-se como elemento chave para uma ação efetiva do volátil do óleo essencial de *T. minuta* sobre *S. sclerotiorum* em condições in vitro.

No volume de 100 μ L, in vitro, o óleo essencial de *T. minuta* mostrou-se eficiente em qualquer tempo de exposição sobre *M. phaseolina*.

Em volumes inferiores a 100 μ L do óleo essencial de *T. minuta*, o tempo mostrou-se como elemento importante para a inibição de crescimento micelial de *M. phaseolina* em condições in vitro.

A utilização do óleo essencial de *T. minuta*, via volatilização, no tratamento de sementes de feijão da cv. BRS Expedito e Carioca, reduziu a incidência e a severidade das doenças causadas pelos patógenos *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina*, mostrando-se volume-dependente.

O volume de 1200 μ L do óleo essencial de *T. minuta*, via volatilização, promoveu menor incidência das doenças ocasionadas por *S. sclerotiorum* nas plântulas da cv. Expedito e Carioca e menor severidade nas plântulas da cv. Expedito.

O volume de 4800 μ L do óleo essencial de *T. minuta*, no tratamento de sementes de feijão, via volatilização, promoveu menor incidência e severidade da doença ocasionada por *M. phaseolina* nas plântulas da cv. Expedito e Carioca.

O óleo essencial de *T. minuta* apresentou maior eficiência na incidência e severidade da doença ocasionada por *S. sclerotiorum* do que a promovida por *M. phaseolina*.

Os volumes utilizados de tratamento do óleo essencial de *T. minuta* para o controle das doenças ocasionadas por *S. sclerotiorum* e *M. phaseolina* apresentaram baixa correlação negativa com as variáveis de crescimento das plantas de feijão da cv. BRS Expedito e Carioca.

A cultivar BRS Expedito e Carioca demonstraram comportamentos diferenciados em resposta a interação existente entre patógeno e óleo essencial de *T. minuta*.

O tratamento de sementes de feijão com o uso de voláteis do óleo essencial de *T. minuta* se mostrou uma estratégia promissora para a produção de sementes agroecológica e necessita novos estudos para aprimorar a técnica de utilização em maior escala.

Referências

ABD-ALLA, M.A.; EL-MOHAMEDY, R.S.R.; BADEAA, R.I. Effect of some volatile compounds on black mould disease on onion bulbs during storage. **Research Journal of Agriculture and Biological Sciences**, v.2, n.6, p.384-390, 2006.

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectrometry**, 4th ed., Allured Publ. Corp, Carol Stream, IL, USA, 2009.

AGUILAR-GONZÁLES, A.E.; PALOU, E.; LÓPES-MALO, A. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.32, p.181-185, 2015.

AGUILAR-GONZÁLES, A.E.; PALOU, E.; LÓPES-MALO, A. Response of *Aspergillus niger* inoculated on tomatoes exposed to vapor phase mustard essential oil for short or long periods and sensory evaluation of treated tomatoes. **Journal of Food Quality**, p.1-7, 2017.

AIDAR, H.; KLUTHUCOUSKI, J. Realidade versus sustentabilidade na produção do feijoeiro comum. In: KLUTHUCOUSKI, J.; STONE, L.F.; AIDAR, H. **Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 21-33p.

AL-TAISAN, W.A.; BAHKALI, A.H.; ELGORBAN, A.M.; EL-METWALLY, M.A. Effective influence of essential oils and microelements against *Sclerotinia sclerotiorum*. **International Journal of Pharmacology**, v.10, n.1, p.275-281, 2014.

ALVES, M.C.S.; MEDEIROS FILHO, S.; INNECCO, R.; TORRES, S.B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v.39, n.11, p.1083-1086, 2004.

ANDRADE, E.T.; CORREA, P.C.; TEIXEIRA, L.P.; PEREIRA, R.G.; CALOMENI, J.F. Cinética de secagem e qualidade de sementes de feijão. **ENGEVISTA**, v.8, n.2, p.83-95, 2006.

ANTUNES, I.F. Feijão. In: BARBIERI, R.L.; STUMPF, E.R.T. **Origem e Evolução de Plantas Cultivadas**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 359p-376p.

ANTUNES, I.F.; SILVEIRA, N.T.; SILVEIRA, E.P.; BEVILAQUA, G.A.P.; EMYGDIO, B.M.; EICHHOLZ, C. Melhoramento do feijão ao alcance de todos – cruzamentos. **Documento 325**: Embrapa Clima Temperado. Pelotas, RS, 2010. 39p.

ANVISA. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimento (PARA)**: relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 16 de mai. 2018.

ANŽLOVAR, S.; LIKAR, M.; KOCE, J.D. Antifungal potential of thyme essential oil as a preservative for storage of wheat seeds. **Acta Botanica Croatica**, v.76, n.1, p.64–71, 2017.

AUMONDE, T.Z. **Ação de extratos vegetais no desempenho de sementes e plântulas de alface e arroz vermelho**. 2012. 67f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2012.

BALARDIN, R.S.; PASTOR-CORRALES, M.A. Reação de germoplasma de *Phaseolus vulgaris* a nove raças de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, n.4, p.269-273. 1990.

BALANDRÁN, J.J.B.; PÉREZ, N.M. Evaluación no destructiva de la patogenicidad de *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v.26, n.1, p.71-75, 2008.

BATISH, D.R.; KOMAL ARORA, K.; SINGH, H.P.; KOHLI, R.K. Potential utilization of dried powder of *Tagetes minuta* as a natural herbicide for managing rice weeds. **Crop Protection**, v.26, p.566–571, 2007.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. **Manual de fitopatologia: doenças de plantas cultivadas**, v.2. São Paulo, SP: Agronômica Ceres, 1997. 376p-399p.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba, PR: Layser Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 160p.

BOTELHO, L.S.; ZANCAN, W.L.A.; MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N. Performance of Common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v.35, n.2, p.153-160, 2013.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009a. 200p.

BRASIL. Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regra para Análise de Sementes**. Brasília: MAPA/ACS, 2009b. 339p.

BRASIL. **Instrução normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/sustentabilidade/organicos/produtos-fitossanitarios/IN46.2011alteradapelaIN17.2014epelaIN35.2017.pdf>> Acesso em: 16 de mai. 2018.

CARDOSO, José Emilson. Mofo branco. In: SARTORATO, A.; RAVA, C.A. **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. BRASÍLIA: Embrapa-SPI, 1994. 111p-122p.

CARDOSO, J.E.; RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Doenças causadas por fungos de solo. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba, SP: POTOFOS, 1996. 701p-722.

CHAMORRO, E.R.; BALLERINI, G.; SEQUEIRA, A.F.; VELASCO, G.A.; ZALAZAR, M.F. Chemical composition of essential oil from *Tagetes minuta* L. Leaves and flowers. **Journal of the Argentine Chemical Society**, v.96, n.1-2, p.80-86, 2008.

COMISSÃO TÉCNICA SUL- BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações Técnicas para o Cultivo de Feijão, na Região Sul Brasileira/2009**. Florianópolis: Epagri, 2010. 163p.

COMISSÃO TÉCNICA SUL-BRASILEIRA DE FEIJÃO. **Informações técnicas para o cultivo de feijão na Região Sul brasileira**. 2.ed. Florianópolis: Epagri, 2012. 157p.

CONAB. Campanha Nacional de Abastecimento. **Série histórica das safras: feijão total (1º, 2º e 3º safras)**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/serie-historica-das-safras?start=20>>. Acesso em: 15 de ago. de 2018.

CORNELIUS, W.W., WYCLIFFE, W. *Tagetes (Tagetes minuta) Oils*. In: Preedy, V.R. (Ed.), **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Academic Press 2016. 791–802p.

CABRAL, L.C.; PINTO, V.F.; PATRIARCA, A. Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin in food. **International Journal of Food Microbiology**, v.166, n.1, p.1-14, 2013.

DIDONET, A.D.; MOREIRA, J.A.A.; FERREIRA, E.P.B. Sistema de Produção Orgânico de Feijão para Agricultores Familiares. **Comunicado técnico**: Embrapa. Santo Antônio de Goiás, GO, 2009.

DHINGRA, O.D.; JHAM, G.N.; RODRIGUES, F.A.; SILVA, G.J.; COSTA JR., M.L.N. Fumigation with essential oil of mustard retards fungal growth and accumulation of ergosterol and free fatty acid in stored shelled groundnuts. **Journal of Stored Products Research**, v.45, p.24-31, 2009.

DIDWANIA, N.; SADANA, D.; TRIVEDI, P.C. Antibacterial activity of a few medicinal plants against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. **International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences**, v.4, n.2, p.177-182, 2013.

EDRIS, A.E.; FARRAG, E.S. Antifungal activity of peppermint and sweet basil essential oils and their major aroma constituents on some plant pathogenic fungi from the vapor phase. **Nahrung/Food**, v.47, n.2, p.117-121, 2003.

EQUIPE ESTATCAMP. **Software Action**. Estatcamp – Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos, SP, Brasil. 2014. URL <http://www.portalaction.com.br/>.

FAO. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura. Disponível em: <<http://www.fao.org/family-farming-2014/pt/>>. Acesso em: 17 de mai. 2018.

FERREIRA, A.G.; ÁQUILA, M.E.A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12 (Edição Especial), p.175-204, 2000.

FERREIRA, L.U.; MELO, P.G.S.; LOBO JUNIOR, M.; WENDLAND, A.; PEREIRA, H.S.; MELO, L.C.; FARIA, L.C.; SOUZA, T.L.P.O. Common bean white mold resistance sources identified by greenhouse screening in Brazil. **Annual Reporto f the Bean Improvement Cooperative**, v.57, p.169-170, 2014.

FIALHO, R.O.; PAPA, M.F.S.; CERESINI, P.C. Doenças. In: ARF, O.; LEMOS, L.B.; SORATTO, R.P.; FERRARI, S. (Ed.) **Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1 ed. Botucatu, SP: FEPAF, 2015. 253-282p.

FONSECA, M.C.M.; LEHNER, M.S.; GONÇALVES, M.G.; PAULA JÚNIOR, T.J.; SILVA, A.F.; BONFIM, F.P.G.; PRADO, A.L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.45-50, 2015.

FREDDO, Á.R. **Potencial do óleo de *Aloysia citriodora* Palau no controle de fitopatógenos e na indução de resistência ao tombamento de plântulas de feijão, pepino e beterraba**. 2015 – 124f. – Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

FREITAS, F.O. Evidências genético-arqueológicas sobre a origem do feijão comum no Brasil. **Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.41, n.7, p.1199-1203, 2006.

GAKUUBI, M.M.; WANZALA, W.; WAGACHA, J.M.; DOSSAJI, S.F. Bioactive properties of *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) essential oils: A review. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v.4, n.2, p.27-36, 2016.

GAÑÁN, N.A. **Extracción y fraccionamiento de biocidas de origen natural mediante el uso de fluidos supercríticos**. 2014. 265p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidad Nacional Del Sur, Bahia Blanca.

GARCÍA, C.S.; CRUZ, M.; MARTIN, E.L.; MORA, M.L.; MARTÍN, M.C.; CAPÓ, Y.A.; SUÁREZ, M.A.; ROQUE, B.; PÉREZ, M. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Cymbopogon nardus* para el control de *Macrophomina phaseolina*. **Centro Agrícola**, v.35, n.3, p.83-86, 2008.

GEPTS, P.; DEBOUCK, D.G. Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). In: SCHOONHOVEN, A. Van.; VOYSEST, O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**. Cali: CIAT, 1991. 7p-53p.

GIACOMINI, G.; NACHTIGAL, G.F.; SCHIEDECK, G.; VALGAS, R.A.; GIACOMINI, R.X.; LIMA, D.L. Atividade fitotóxica de extratos aquosos e óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. **Revista Cadernos de Agroecologia**, v.8, n.2, p.1-5, 2013.

GIRARDI, N.S.; GARCÍA, D.; PASSONE, M.A.; Nesci, A.; ETCHEVERRY, M. Microencapsulation of *Lippia turbinata* essential oil and its impact on peanut seed quality preservation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.116, p.227-233, 2017.

GOMES, F.T. **Avaliação do perfil químico do óleo essencial de populações espontâneas de *Tagetes minuta* L. (Asteraceae) na região do Rio Grande do Sul.** 2017. 47f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Pelotas. 2017.

GUPTA, G.K.; SHARMA, S.K.; RAMTEKE, R. Biology, epidemiology and management of the pathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with special reference to charcoal rot of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). **Jornal of Phytopathology**, v.160, p.167-180, 2012.

HENNING, A.A.; ALMEIDA, A.M.R.; GODOY, C.V.; SEIXAS, C.D.S.; YORINORI, J.T.; COSTAMILAN, L.M.; FERREIRA, L.P.; MEYER, M.C.; SOARES, R.M.; DIAS, W.P. Manual de identificação de doenças de soja. **Documentos 256**. 5. ed. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2014. 76p.

HENNING, A.A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais **Documentos 264**. 2. ed. Londrina, PR: Embrapa Soja, 2005. 52p.

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**, v.14, n.3, p.439-45, 2012.

HOOKS, C.R.R.; WANG, K.; PLOEG, A.; McSORLEY, R. Using marigold (*Tagetes* spp.) as a cover crop to protect crops from plant-parasitic nematodes. **Applied Soil Ecology**, v.46, n.3, p.307-320, 2010.

HONG, J.K.; YANG, H.J.; JUNG, H.; YOON, D.J.; SANG, M.K.; JEUN, Y. Application of volatile antifungal plant essential oils for controlling pepper fruit anthracnose by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathol. J.**, v.31, n.3, p.269-277, 2015.

HULINA, N. Wild marigold - *Tagetes minuta* L., New weed on the Island of Hvar, and new contribution to the knowledge of its distribution in Dalmatia (Croatia). **Agriculturae Conspectus Scientificus**, v.73, n.1, p.23-26, 2008.

IJAZ, S.; SADAQAT, H.A.; KHAN, M.N. A review of the impact of charcoal rot (*Macrophomina phaseolina*) on sunflower. **Journal of Agricultural Science**, v.151, p.222-227, 2013.

INOUYE, Shigeharu. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 1). **The International Journal of Aromatherapy**, v.13, n.2/3, p.1-13, 2003a.

INOUE, Shigeharu. Laboratory evaluation of gaseous essential oils (Part 2). **The International Journal of Aromatherapy**, v.13, n.4, p.1-12, 2003b.

JHALA, R.; HIGGINS, R.; ESKRIDGE, K.; STEADMAN, J.R. Characterized isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* can facilitate identification and verification of resistance to white mold in dry and snap beans. **Annual Reporto of the Bean Improvement Cooperative**, v.57, p.57-58, 2014.

KARACA, G.; BILGINTURAN, M.; OLGUNSOY, P. Effects of some plant essential oils against fungi on wheat seeds. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v.51, n.3, p.385-388, 2017.

KHALEDI, N.; TAHERI, P.; TARIGHI, S. Antifungal activity of various essential oils against *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina* as major bean pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.118, p.704-717, 2014.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas: plantas superores-dicotiledônes- TOMO II**. São Paulo, SP: BASF, 1995. p 683.

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

KUMAR, S.; SHARMA, S.; PATHAK, D.V.; BENIWAL, J. Integrated management of jatropha root rot caused by *Rhizoctonia bataticola*. **Journal of Tropical Forest Science**, v.23, n.1, p.35-41, 2011.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? **Letters in Applied Microbiology**, v.54, p.169-174, 2011.

LIMA, R.C.; LEHNER, M.S.; PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; SILVA, R.A.; TEIXEIRA, H.; CARNEIRO, J.E.S. Physiological resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean lines in the State of Minas Gerais, Brazil. **Annual Reporto of the Bean Improvement Cooperative**, v.56, p.49-50, 2013.

LONDRES, Flavia.. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro, RJ: AS-PTA, 2011. 190 p.

LÓPEZ, M.L.; BONZANI, N.E.; ZYGADLO, J.A. Allelopathic potential of *Tagetes minuta* terpenes by a chemical, anatomical and phytotoxic approach. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p.882-890, 2009.

LORINI, A.; BONALDO, S.M.; MENDES, B.L. Efeito volátil de óleos essenciais no desenvolvimento de patógenos em amêndoas de castanhas-do-brasil. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.15, n.2, p.121-126, 2016.

LOVATTO, P.B. **As plantas bioativas como estratégia à transição agroecológica na agricultura familiar: análise sobre a utilização empírica e experimental de extratos botânicos no manejo de afídeos em hortaliças**. 2012. 392f. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2012.

LUCCA FILHO, O.A.; FARIAS, C.R.J. Patologia de sementes. In: PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, O.A.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 3 ed. Pelotas, RS: UFPEL, 2012. 259p-330p.

MA, B.; BAN, X.; HUANG, B.; HE, J.; TIAN, J.; ZENG, H. Interference and mechanism of dill seed essential oil and contribution of carvone and limonene in preventing *Sclerotinia* rot of rapeseed. **PLOS ONE**, v.10, n.7, 2015.

MACHADO, José da Cruz. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. Lavras: ESAL/FAEPE, 1988. 107p.

MAFIA, L. A.; MIZUBUTI, E. S. G.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Quantificação de doenças em planta. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 161p-173p.

MANNA, M.; KIM, K.D. Control strategies for deleterious grain fungi and mycotoxin production from preharvest to postharvest stages of cereal crops: A Review. **Life Science and Natural Resources Research**, v.25, p.13-27, 2017.

MANOS, M.G.L.; OLIVEIRA, M.G.O.; MARTINS, C.R. Informações Técnicas para o Cultivo do Feijoeiro Comum na Região Nordeste Brasileira 2012-2014. **Documentos 181**. Aracaju, SE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2013. 199 p.

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

MARCOMINI, A.M.; ALVES, L.F.A.; BONINI, A.K.; MERTZ, N.R.; SANTOS, J.C. Atividade inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.3, p.409-416, 2009.

MARQUES, J.S.. **Compostos ativos de folhas de *Eugenia uniflora* e seus efeitos contra mofo branco causado por *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de feijoeiro**. 2014 – 81f. – Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia. Instituto de Ciências Biológicas (ICB). Universidade Federal do Goiás.

MARTINS, J.A.S.; SAGATA E.; 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**, v.27, n.1, p.49-51, 2010.

MASANGWA, J.I.G.; KRITZINGER, Q.; AVELING, T.A.S. Germination and seedling emergence responses of common bean and cowpea to plant extract seed treatments. **Journal of Agricultural Science**, v.155, p.18-31, 2017.

MBEGA, E.R.; MABAGALA, R.B.; MORTENSEN, C.N.; WULFF, E.G. Evaluation of essential oils as seed treatment for the control of *Xanthomonas* spp. associated with the bacterial leaf spot of tomato in Tanzania. **Journal of Plant Pathology**, v.94, n.2, p.273-281, 2012.

MEDEIROS, C.H.; SIGNORINI, C.B.; SCHIEDECK, G. Alelopatia do extrato aquoso e óleo essencial de *Tagetes minuta* L. (Chinchilho) na germinação de sementes de alface. **Revista Cadernos de Agroecologia**, v.8, n.2, p.1-4, 2013.

MENA-RODRÍGUEZ, E.; ORTEGA-CUADROS, M.; MERINI, L.; MELO-RÍOS, A.E.; TOFIÑO-RIVERA, A. Efecto de agroinsumos y aceites esenciales en el suelo de hortalizas en el Caribe colombiano. **Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria**, v.19, n.1, p.103-124, 2018.

MIGLIORINI, P., RODRIGUES, G.F.; CHAGAS, H.L.; SILVA, R.N.O.; TUNES, L.V.M. Métodos de inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de feijão. **Enciclopédia Biosfera**, v.13, n.23, p.794-801, 2016.

MIRANDA, C.A.S.F.; CARDOSO, M.G.; CARVALHO, M.L.M.; MACHADO, S.M.F.; GOMES, M.S.G.; SANTIAGO, J.A.; TEIXEIRA, M.L. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: Ciências Agrárias**, v.36, n.3, p.1783-1798, 2015.

MONDEGO, J.M.; MELO, P.A.F.R.; PINTO, K.M.S.; NASCIMENTO, L.C.; ALVES, E.U.; BATISTA, J.L. Controle alternativo da microflora de sementes de *Pseudobombax marginatum* com óleo essencial de copaíba (*Copaifera* sp.). **Bioscience Journal**, v.30, n.2, p.349-355, 2014.

MORAIS, L.A.S.. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v.27, n.2, p.4050-4063, 2009.

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

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

OLANDA, Gabriela Berguenmaier de. **Uso de plantas bioativas no controle da antracnose na cultura o feijão**. 2014 – 52f. – Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

OLIVEIRA, S.H.F. de. Manejo do mofo branco. **Revista DBO Agrotecnologia**, v.2, n.4, 2005.

PANSERA, M.R.; VICENÇO, C.B.; PRANCUTTI, A.; SARTORI, V.C.; RIBEIRO, R.T.S. Controle alternativo do fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (LIB.) De Bary causador da podridão de *Sclerotinia*, com óleos essenciais e extratos vegetais. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.7, n.3, p.126-133, 2012.

PAULA JÚNIOR, T.J.; WENDLAND, A. **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: Epamig, 2012. 157p.

PAULA JÚNIOR, T.J.; VIEIRA, R.F.; TEIXEIRA, H.; CARNEIRO, J.E.S. **Guia técnico: produção do feijão**. Viçosa, MG: EPAMIG, 2010. 49p.
PEREIRA, I.S.; CAMPOS, A.D.; GOMES, C.B.; PORTO, F.G.S.; MACEDO, J.K. Óleo essencial de chinchilho (*Tagetes minuta* L.) como alternativa para o controle da requeima na cultura da batata. **Cadernos de Agroecologia**, v.8, n.2, 2013.

PEREIRA, R.B.; SILVA, P.P.; NASCIMENTO, W.M.; PINHEIRO, J.B. Tratamento de sementes de hortaliças. **Circular Técnica 140**. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2015. 16p.

PESKE, S.T.; BARROS, A.C.S.A. Produção de sementes. In: PESKE, S.T.; LUCCA FILHO, O.A.; BARROS, A.C.S.A. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos**. 3 ed. Pelotas, RS: UFPEL, 2012. 15p-98p.

PÉREZ, R.S.B.; MONTES-BELMONT, R.; AYALA, F.C.; FLORES-MOCTEZUMA, H.E.; CRUZ, M.A.S. Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. **Revista Mexicana de Micología**, v.34, p.85-91, 2011.

PORCH, T.G.; BEAVER, J.S.; COLOM, S.; VARGAS, A., Y. TRUKHINA, Y.; ESTEVEZ DE JENSEN, C. Development of tools for *Macrophomina phaseolina* evaluation and for genetic improvement of common bean. **Annual Reporto of the Bean Improvement Cooperative**, v.57, p.189-190, 2014.

RAVA, C.A.; COSTA, J.G.C. Produção de sementes sadia. In: KLUTHUCOUSKI, J.; STONE, L.F.; AIDAR, H. **Fundamentos para uma agricultura sustentável, com ênfase na cultura do feijoeiro**. Santo Antônio de Goiás, GO: Embrapa Arroz e Feijão, 2009. 237-248p.

RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ. Guanabara Koogan LTDA, 2011. 830p.

RODRIGUES, E.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; STANGARLIN, J.R.; SCAPIM, C.A.; FIORI-TUTIDA, A.C.G. Potencial da potencial planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum. Agronomy**, v.28, n.2, p.213-220, 2006.

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

SADGROVE, N.; JONES, G.A Contemporary introduction to essential oils: chemistry, bioactivity and prospects for Australian agriculture. **Agriculture**, v.5, n.1, p.48-102, 2015.

SAHA, S.; WALIA, S.; KUNDU, A.; KUMAR, B.; JOSHI, D. Antifungal Acetylinic Thiophenes from *Tagetes minuta*: Potential Biopesticide. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v.85, n.1, p.207-211, 2012.

SALINAS-SÁNCHEZ, D.O.; ALDANA-LLANOS, L.; VALDÉS-ESTRADA, M.E.; GUTIÉRREZ-OCHOA, M.; VALLADARES-CISNEROS, G.; RODRÍGUEZ-FLORES, E. Insecticidal activity of *Tagetes erecta* extracts on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). **Florida Entomologist**, v.95, n.2, p.428-432, 2012.

SANTOS, P.C.; SANTOS, V.H.M.; MECINA, G.F.; ANDRADE, A.R.; FIGUEIREDO, P.A.; MORAES, V.M.O.; SILVA, L.P.; SILVA, R.M.G. Insecticidal activity of *Tagetes* sp. on *Sitophilus zeamais* Mots. **International Journal of Environmental & Agriculture Research (IJOEAR)**, v.2, n.4, p.31-38, 2016.

SARMENTO-BRUM, R.B.C.; SANTOS, G.R.; CASTRO, H.G.; GONÇALVES, C.G.; CARDON, C.H.; LEÃO, E.U.; SARMENTO, R.A. Avaliação *in vitro* de diferentes métodos de análises de fungitoxicidade de óleos essenciais. **Bioscience Journal**, v.29, n.3, p.623-626, 2013.

SCHOONHEN, A.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Sistema Stándar para la evaluación de germoplasma de frijol**. Cali, Colômbia: CIAT, 1987, 56p.

SHAHZADI, I.; AHMAD, R.; WAHEED, U.; SHAH, M.M. Genetic diversity analysis of *Tagetes* species using pcr based molecular markers. **Pakistan Journal of Botany**, v.48, n.4, p.1593-1599, 2016.

SHARMA, N.; TRIPATHI, A. Integrated management of postharvest *Fusarium* rot of gladiolus corms using hot water, UV-C and *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. essential oil. **Postharvest Biology and Technology**, v.47, n.2, p.246-254, 2008.

SHIN, M.H.; KIM, J.; CHOI, H.; KEUM, Y.S.; CHUN, S.C. Effect of thymol and linalool fumigation on postharvest diseases of table grapes. **Mycobiology**, v.42, n.3, p.262-268, 2014.

SMITHSON, M.; VERKUILEN, J. Fuzzy Set Theory: Applications in the Social Sciences. Thousand Oaks, CA: Sage. **Sociological Methods & Research**, v.37, n.3, p.455-457, 2006.

SILVA, A.C.; MACHADO, J.C. Tratamento de sementes com compostos derivados de plantas no controle de fitopatógenos. In: SCHUSCH, L.O.B.; VIEIRA, J.F.; RUFINO, C.A.; ABREU JÚNIOR, J.S. **Sementes: produção, qualidade e inovações tecnológicas**. Pelotas, RS: UFPEL, 2013. 119p-150p.

SILVA, G.C.; SANTOS, C.C.; GOMES, D.P. Incidência de fungos e germinação de sementes de feijão-caupi (*Vigna unguiculata* L. (Walp) tratadas com óleo de nim (*Azadirachta indica* A. Juss). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.850-855, 2014.

SILVA, R.N.O.; MIGLIORINI, P.; JUNGES, E.; NUNES, A.F.; TUNES, L.V.M. Métodos de inoculação de *Rhizoctonia bataticola* (taub.) (*Macrophomina phaseolina* (tassi) goid) em sementes de feijão. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v.11, n.4, p.7-11, 2016.

SOFKOVA, S.; KIRYAKOV, I. Sources of physiological resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Phaseolus vulgaris* lines from Bulgaria. **Annual Reporto of the Bean Improvement Cooperative**, v.57, p.77-78, 2014.

SOYLU, S.; YIGITBAS, H.; SOYLU, E.M.; KURT, S. Antifungal effects of essential oils from oregano and fennel on *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, p.1021-1030, 2007.

SOYLU, E.M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. **International Journal of Food Microbiology**, v.143, n.3, p.183-189, 2010.

STANGARLIN, J.R.; KUHN, O.J.; TOLEDO, M.V.; PORTZ, R.L.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; PASCHOLATI, S.F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.10, n.1, p.18-46, 2011.

STEADMAN, J.R.; KOLKMAN, J.M.; ESKRIDGE, K.M. Screening for and identifying sources of resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in common bean. **Annual Reporto of the Bean Improvement Cooperative**, v.45, p.49-49, 2002.

TAGNE, A.; AMVAM ZOLLO, P.H.; FONTEM, D.A.; MATHUR, S.B.; NEERGAARD, E. Fungicides and essential oils for controlling maize seed-borne *Fusarium moniliforme* and its transmission into seedlings. **World Journal of Agricultural Sciences**, v.9, n.3, p.290-297, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 4 ed. Porto Alegre. Artmed, 2009.

TARSITANO, M.A.A.; SANT'ANA, A.L.; TARSITANO, R.A. Aspectos sociais e econômicos da produção de feijão. In: ALF, O.; LEMOS, L.B.; SORATTO, R.P.; FERRARI, S. **Aspectos gerais da cultura do feijão (*Phaseolus vulgaris* L.)**. 1 ed. Botucatu, SP: FEPAF, 2015. 15-27p.

TOFIÑO-RIVERA, A.; ROYERO-LÓPEZ, L.; ORTEGA-CUADROS, M. Compatibilidad *in vitro* de agroquímicos, bioinsumos y aceite esencial en el control de *Macrophomina phaseolina* aislado de frijol. **Vitae**, v.23, n.1, p.473-477, 2016.

TER BRAAK, C.J.F.; ŠMILLAUER, P. **Canoco reference manual and canodraw for windows user's guide: software for canonical community ordination (version 4.5)**. Ithaca, NY: Microcomputer Power, 2002.

TRIPATHI, N.N.; KUMAR, N. *Putranjiva roxburghii* oil - A potential herbal preservative for peanuts during storage. **Journal of Stored Products Research**, v.43, n.1, p.435-442, 2007.

TUREK, C.; STINTZING, F.C. Stability of Essential Oils: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.12, n.1, p.40-53, 2013.

VAN DER WOLF, J.M.; BIRNBAUM, Y.; VAN DER ZOUWEN, P.S.; GROOT, S.P.C. Disinfection of vegetable seed by treatment with essential oils, organic acids and plant extracts. **Seed Science & Technology**, v.36, p.76-88, 2008.

VASUDEVAN, P.; KASHYAP, S.; SHARMA, S. *Tagetes*: a multipurpose plant. **Bioresource Technology**, v.62, n.1 e 2, p.29-35, 1997.

VENTUROSO, L.R.; BACCHIII, L.M.A.; GAVASSONIII, W.L.; VENTUROSO, L.A.C.; PONTIM, B.C.A.; REIS, F.G. Inoculação de *Sclerotinia sclerotiorum* em sementes de oleaginosas: transmissão e seus efeitos sobre a emergência de plantas. **Ciência Rural**, v.45, n.5, p.788-793, 2015.

VICENÇO, C.B.; FELTRACCO, M. C.; CAVIÃO, H.C.; PANSEIRA, M.R.; SARTOR, V.C. Composição química e atividade *in vitro* de óleos essenciais sobre a mancha púrpura da soja. **Revista Interdisciplinar de Ciência Aplicada**, v.2, n.4, p.12-16, 2017.

VIEIRA, C.; BORÉM, A.; RAMALHO, M.A.P.; CARNEIRO, J.E.S. Melhoramento de feijão. In: BORÉM, A. **Melhoramento de plantas cultivadas**. 2 ed. Viçosa, MG: UFV, 2005. p.301-391.

VIEIRA, J.F.; VIEIRA, J.F.; SOARES, V.N.; AMARANTE, L. Alelopatia e seus efeitos na germinação e no crescimento de plantas. In: SCHUSCH, L.O.B.; VIEIRA, J.F.; RUFINO, C.A.; ABREU JÚNIOR, J.S. **Sementes: produção, qualidade e inovações tecnológicas**. Pelotas, RS: UFPEL, 2013. 321p-344p.

VILHORDO, R.W.; MIKUSISKI, O.M.F.; BURIN, M.E.; GANDOLFI, V.H. Morfologia. In: ARAÚJO, R.S.; RAVA, C.A.; STONE, L.F.; ZIMMERMANN, M.J.O. **Cultura do feijoeiro comum no Brasil**. Piracicaba, SP: PATOFOS, 1996. 71p-97p.

VISINTIN, A.M.; BERNARDELLO, G. Morfología y anatomía floral de *Tagetes minuta* (Asteraceae). **Arnaldoa**, v.12, n.15, p.8-15, 2005.

XAVIER, M.V.A.; BRITO, S.S.S.; OLIVEIRA, C.R.F.; MATOS, C.H.C.; PINTO, M.A.D. S.C. Óleo essencial de *Baccharis trimera* (Less.) DC. sobre o potencial fisiológico de sementes de feijão caupi. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.esp., p.214-217, 2012.

Anexos

Anexo A

Crescimento micelial médio (mm) de *Sclerotinia sclerotiorum* e *Macrophomina phaseolina* expostos aos voláteis de diferentes volumes de óleo essencial de *Tagetes minuta* após 24, 48 e 72 horas de exposição. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Patógeno	Volume (µL)	Crescimento micelial (mm)					
		24 horas		48 horas		72 horas	
		Média	dp	Média	dp	Média	dp
<i>S. sclerotiorum</i>	0	14,25	0,53	42,42	2,47	81,17	3,02
	2	14,00	1,04	21,25	0,36	54,25	3,20
	5	0,00		0,00		10,05	0,39
	10	0,00		0,00		0,00	
	15	0,00		0,00		0,00	
	20	0,00		0,00		0,00	
<i>M. phaseolina</i>	0	14,42	0,52	65,67	0,63	80,00	
	25	0,00		15,08	0,40	52,92	1,43
	30	0,00		10,25	0,56	39,58	2,15
	35	0,00		10,17	0,86	33,33	2,71
	40	0,00		3,00	3,00	15,83	8,21
	45	0,00		0,00		10,00	6,45
	50	0,00		0,00		10,08	5,12
	55	0,00		1,67	1,67	11,33	6,08
	60	0,00		0,00		5,42	2,50
	65	0,00		0,00		3,17	2,01
	70	0,00		0,00		3,00	1,91
75	0,00		0,00		0,00		

Anexo B

Valores médios e desvio padrão (dp) do crescimento micelial e da taxa de inibição de crescimento micelial (TIC) de *Sclerotinia sclerotiorum* submetido aos voláteis do óleo essencial de *Tagetes minuta* em diferentes volumes e tempos de exposição (n=102), após 30 dias de observação. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Fonte de variação	Crescimento micelial (mm)		TIC		
	média	dp	média	dp	
Volume de óleo essencial (μL)	0	55,1944	0,9264	0,0000	-
	10	26,6150	1,6327	0,5172	0,0300
	15	21,3124	1,6648	0,6132	0,0305
	20	19,5171	1,1942	0,6461	0,0217
	25	0,0000	-	1,0000	-
Tempo de exposição (horas)	0	55,1944	0,9264	0,0000	-
	24	22,5843	2,7925	0,5901	0,0509
	48	21,3669	2,7069	0,6124	0,0492
	72	13,2342	1,6807	0,7600	0,0305
	96	10,2590	1,3434	0,8140	0,0244

Anexo C

Valores médios e desvio padrão (dp) do número de escleródios e da massa de escleródios de *Sclerotinia sclerotiorum* submetido aos voláteis do óleo essencial de *Tagetes minuta* em diferentes volumes e tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Variável		Número escleródios		Massa de escleródios	
		Média	dp	Média (g)	dp
Volume de óleo essencial (μL)	0	8,8333	0,4014	55,0376	1,8569
	10	7,5417	0,4623	38,7035	2,8277
	15	7,3750	0,3845	37,1591	3,3901
	20	7,0833	0,4997	32,2798	2,4855
	25	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
Tempo de exposição (horas)	0	8,8333	0,4014	55,0376	1,8569
	24	5,5833	0,7869	35,3318	4,9022
	48	6,2917	0,7743	33,6928	4,1435
	72	6,5833	0,8360	25,3752	3,4825
	96	3,5417	0,4544	13,7426	1,7225

Anexo D

Valores médios e desvio padrão (dp) do crescimento micelial e taxa de inibição de crescimento micelial (TIC) de *Macrophomina phaseolina* submetido aos voláteis do óleo essencial de *Tagetes minuta* em diferentes volumes e tempos de exposição (n=102). Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Fonte de variação		Crescimento micelial (cm)		TIC	
		média	dp	média	dp
Volume de óleo essencial (μ L)	0	53,5556	0,5704	0,0000	-
	75	23,6698	2,3168	0,5579	0,0433
	80	21,4970	2,2531	0,5981	0,0423
	85	19,3398	2,0447	0,6384	0,0384
	90	16,5287	1,2874	0,6911	0,0240
	95	16,0025	1,1473	0,7008	0,0217
	100	0,0000	-	1,0000	-
Tempo de exposição (horas)	0	53,5556	0,5704	0,0000	-
	24	26,1114	2,4623	0,5120	0,0461
	48	17,8445	1,3768	0,6667	0,0257
	72	11,7793	1,0203	0,7797	0,0192
	96	8,9567	0,7452	0,8326	0,0140

Anexo E

Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) e Análise de Componentes Principais (PCA) para sementes de cv. BRS Expedito e Carioca, infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum*, utilizando variáveis de crescimento e sanidade como variáveis resposta e diferentes volumes do óleo essencial de *Tagetes minuta* como variáveis explicativas. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

**** Summary ****DCA – EXPEDITO – SCLEROTINIA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues:	0.017	0.001	0.000	0.000	0.019
Lengths of gradient:	0.554	0.221	0.086	0.310	
Cumulative percentage variance of species data:	92.1	95.4	96.2	96.5	
Sum of all eigenvalues					0.019
**** Summary ****PCA – EXPEDITO – SCLEROTINIA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues:	0.427	0.340	0.138	0.041	1.000
Lengths of gradient:	42.7	76.7	90.5	94.6	
Cumulative percentage variance of species data:					1.000
**** Summary ****DCA – CARIOCA – SCLEROTINIA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues:	0.079	0.001	0.000	0.000	0.085
Lengths of gradient:	0.587	0.259	0.254	0.279	
Cumulative percentage variance of species data:	93.2	94.4	94.9	95.3	
Sum of all eigenvalues					0.085
**** Summary ****PCA – CARIOCA – SCLEROTINIA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues:	0.450	0.210	0.174	0.089	1.000
Lengths of gradient:	45.0	66.0	83.4	92.2	
Cumulative percentage variance of species data:					1.000

Anexo F

Matriz de correlação e *p*-valores entre variáveis de crescimento e de sanidade de sementes de feijão cv. BRS Expedito e Carioca, infectadas com *Sclerotinia sclerotiorum* e não infectadas, em função do volume de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Matriz de correlação de Pearson – cv. Expedito													
Correlação – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>								Correlação – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID		Volume	CPA	CR	MSPA	MSR
Volume	1							Volume	1				
CPA	-0,5182	1						CPA	0,2911	1			
CR	0,1129	-0,0599	1					CR	0,1408	0,2087	1		
MSPA	-0,0871	-0,2988	0,6682	1				MSPA	0,0931	0,1646	0,5244	1	
MSR	0,3951	-0,5091	0,6243	0,7613	1			MSR	0,1602	0,0207	0,6541	0,8046	1
INC	-0,7798	0,3301	-0,0296	0,2763	-0,2009	1							
ID	-0,6718	0,2338	-0,0380	0,3440	-0,1238	0,8588	1						
<i>p</i> -valores – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>								<i>p</i> -valores – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID		Volume	CPA	CR	MSPA	MSR
Volume	1							Volume	1				
CPA	0,0034	1						CPA	0,0228	1			
CR	0,5527	0,7533	1					CR	0,2791	0,1066	1		
MSPA	0,6470	0,1088	5,46e ⁻⁰⁵	1				MSPA	0,4753	0,2049	1,44e ⁻⁰⁵	1	
MSR	0,0307	0,0041	2,27e ⁻⁰⁴	1,03e ⁻⁰⁶	1			MSR	0,2175	0,8742	1,09e ⁻⁰⁸	5,65e ⁻¹⁵	1
INC	3,78e ⁻⁰⁷	0,0748	0,8765	0,1394	0,2871	1							
ID	4,80e ⁻⁰⁵	0,2137	0,8420	0,0627	0,5145	1,27e ⁻⁰⁹	1						
Matriz de correlação de Pearson – Carioca													
Correlação – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>								Correlação – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID		Volume	CPA	CR	MSPA	MSR
Volume	1							Volume	1				
CPA	0,5232	1						CPA	-0,0207	1			
CR	-0,3506	-0,0576	1					CR	0,2081	-0,2152	1		
MSPA	-0,3834	-0,2971	-0,0686	1				MSPA	-0,1015	-0,4877	0,3456	1	
MSR	-0,1154	0,0374	0,0947	0,4724	1			MSR	-0,3480	-0,5869	0,3057	0,7945	1
INC	-0,6693	-0,6296	0,3307	0,6030	0,1691	1							
ID	-0,5137	-0,5354	0,2369	0,7377	0,2617	0,8920	1						
<i>p</i> -valores – <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>								<i>p</i> -valores – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID		Volume	CPA	CR	MSPA	MSR
Volume	1							Volume	1				
CPA	0,0043	1						CPA	0,8627	1			
CR	0,0674	0,7709	1					CR	0,0794	0,0695	1		
MSPA	0,0440	0,1246	0,7288	1				MSPA	0,3963	1,39e ⁻⁰⁵	0,0029	1	
MSR	0,5586	0,8503	0,6318	0,0111	1			MSR	0,0027	6,02e ⁻⁰⁸	0,0090	8,16e ⁻¹⁷	1
INC	9,84e ⁻⁰⁵	3,31e ⁻⁰⁴	0,0856	6,83e ⁻⁰⁴	0,3895	1							
ID	0,0052	0,0033	0,2249	7,49e ⁻⁰⁶	0,1785	1,86e ⁻¹⁰	1						

Anexo G

Análise de Correspondência Destendenciada (DCA) e Análise de Componentes Principais (PCA) para sementes de cv. Expedito e Carioca, infectadas com *Macrophomina phaseolina*, utilizando variáveis de crescimento e sanidade como variáveis resposta e diferentes volumes do óleo essencial de *Tagetes minuta* como variáveis explicativas. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

**** Summary **** DCA – EXPEDITO – MACROPHOMINA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues:	0.097	0.001	0.000	0.000	0.099
Lengths of gradient:	0.673	0.247	0.119	0.119	
Cumulative percentage variance of species data:	97.9	98.8	99.2	99.3	
Sum of all eigenvalues					0.099
**** Summary **** PCA – EXPEDITO – MACROPHOMINA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues:	0.417	0.319	0.125	0.075	1.000
Lengths of gradient:	41.7	73.6	86.1	93.7	
Cumulative percentage variance of species data:					1.000
**** Summary **** DCA – CARIOCA – MACROPHOMINA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total inertia
Eigenvalues:	0.149	0.001	0.000	0.000	0.151
Lengths of gradient:	0.724	0.139	0.095	0.089	
Cumulative percentage variance of species data:	98.6	99.3	99.5	99.6	
Sum of all eigenvalues					0.151
**** Summary **** PCA – CARIOCA – MACROPHOMINA – TODAS AMOSTRAS – VOLUME					
Axes	1	2	3	4	Total variance
Eigenvalues:	0.336	0.247	0.192	0.120	1.000
Lengths of gradient:	33.6	58.3	77.5	89.4	
Cumulative percentage variance of species data:					1.000

Anexo H

Matriz de correlação e *p*-valores entre variáveis de crescimento e de sanidade de sementes de feijão cv. Exedito e Carioca, infectadas com *Macrophomina phaseolina* e não infectadas, em função do volume de óleo essencial de *Tagetes minuta*. Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata, agosto de 2018.

Matriz de correlação de Pearson – cv. Exedito													
Correlação – <i>Macrophomina phaseolina</i>								Correlação – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	
Volume	1							Volume	1				
CPA	-0,1863	1						CPA	0,2911	1			
CR	0,4071	0,4646	1					CR	0,1408	0,2087	1		
MSPA	-0,1616	0,3058	0,1620	1				MSPA	0,0931	0,1646	0,5244	1	
MSR	-0,4387	0,4150	0,0834	0,1589	1			MSR	0,1602	0,0207	0,6541	0,8046	1
INC	-0,5718	-0,0897	-0,5490	0,0604	0,2442	1							
ID	-0,5481	-0,1155	-0,4523	0,0635	0,1690	0,9203	1						
<i>p</i> -valores – <i>Macrophomina phaseolina</i>								<i>p</i> -valores – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	
Volume	1							Volume	1				
CPA	0,3243	1						CPA	0,0228	1			
CR	0,0256	0,0097	1					CR	0,2791	0,1066	1		
MSPA	0,3935	0,1003	0,3925	1				MSPA	0,4753	0,2049	1,44e ⁻⁰⁵	1	
MSR	0,0153	0,0226	0,6612	0,4016	1			MSR	0,2175	0,8742	1,09e ⁻⁰⁸	5,65e ⁻¹⁵	1
INC	0,0010	0,6375	0,0017	0,7511	0,1935	1							
ID	0,0017	0,5434	0,0121	0,7387	0,3720	6,23e ⁻¹³	1						

Matriz de correlação de Pearson – Carioca													
Correlação – <i>Macrophomina phaseolina</i>								Correlação – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	
Volume	1							Volume	1				
CPA	0,1195	1						CPA	-0,0207	1			
CR	0,1305	0,2825	1					CR	0,2081	-0,2152	1		
MSPA	-0,1258	0,5143	0,1175	1				MSPA	-0,1015	-0,4877	0,3456	1	
MSR	0,2801	-0,0516	0,2439	-0,0484	1			MSR	-0,3480	-0,5869	0,3057	0,7945	1
INC	-0,5187	-0,1322	-0,1298	0,0918	-0,0325	1							
ID	-0,4784	-0,1668	-0,0535	0,0525	-0,1867	0,7580	1						
<i>p</i> -valores – <i>Macrophomina phaseolina</i>								<i>p</i> -valores – não inoculado					
	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	INC	ID	Volume	CPA	CR	MSPA	MSR	
Volume	1							Volume	1				
CPA	0,5292	1						CPA	0,8627	1			
CR	0,4918	0,1304	1					CR	0,0794	0,0695	1		
MSPA	0,5078	0,0036	0,5364	1				MSPA	0,3963	1,39e ⁻⁰⁵	0,0029	1	
MSR	0,1339	0,7866	0,1939	0,7997	1			MSR	0,0027	6,02e ⁻⁰⁸	0,0090	8,16e ⁻¹⁷	1
INC	0,0033	0,4861	0,4941	0,6295	0,8645	1							
ID	0,0075	0,3783	0,7789	0,7830	0,3231	1,22e ⁻⁰⁶	1						