

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE ERVILHA PARA O CONTROLE DE
Ascochyta pisi EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO ORGÂNICA**

LUCIA MAYUMI HIRATA

**DOURADOS
MATO GROSSO DO SUL
2006**

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE ERVILHA PARA O
CONTROLE DE *Ascochyta pisi* EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO
ORGÂNICA**

LUCIA MAYUMI HIRATA
Engenheira Agrônoma

ORIENTADOR: Prof. Dr. WALBER LUIZ GAVASSONI

Dissertação apresentada à
Universidade Federal da Grande
Dourados, como parte das
exigências do Curso de
Mestrado em Agronomia, para
obtenção do Título de Mestre
em Agronomia.

Dourados
Mato Grosso do Sul
2006

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFGD

Hirata, Lucia Mayumi

H668t Tratamento de sementes de ervilha para o controle de *Ascochyta pisi* em sistemas de produção orgânica / Lucia Mayumi Hirata. Dourados, MS : UFGD, 2006.
39 f.

Orientador: Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni
Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) –
Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Fitopatologia 2. Ervilha 3. Sementes 4. Controle Físico e Biológico I. Título.

CDD 632.2

**TRATAMENTO DE SEMENTES DE ERVILHA PARA O
CONTROLE DE *Ascochyta pisi* EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO
ORGÂNICA**

por

Lucia Mayumi Hirata

Dissertação apresentada como parte dos requisitos exigidos para
obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA

Aprovada em : 27 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Walber L. Gavassoni
Orientador
UFGD/DCA

Prof^a. Dra. Lillian M. A. Bacchi
Co-orientadora
UFGD/DCA

Prof. Dr. Honório R. dos Santos
Membro da Banca
UFGD/DCA

Pesq. Dr. Celso Dornelas Fernandes
Membro da Banca
EMBRAPA/CNPQC

A DEUS

Aos meus pais,
Masaharu e Inês Masayo Hirata

Aos meus irmãos,
Luzia, Cláudio e Milton

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida, me conceder forças e sabedoria para vencer os obstáculos;

A minha família que esteve presente em todos os momentos;

A Universidade Federal de Mato Grosso do Sul/Universidade Federal da Grande Dourados pela oportunidade concedida;

Aos professores Doutores Walber Luiz Gavassoni e Lílian Maria Arruda Bacchi pela orientação, ensinamento, incentivo e amizade durante o curso;

Ao professor Dr. Honório Roberto dos Santos e ao pesquisador Dr. Celso Dornelas Fernandes (EMBRAPA Gado de Corte), membros da Comissão Julgadora, pelas correções e sugestões;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela bolsa concedida durante um ano de curso, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela bolsa concedida durante seis meses;

A Università degli Studi di Torino (UNITO) com o Programa Alfa/Rede UNISEB, pela bolsa concedida durante seis meses;

A professora Dra. Maria Lodovica Gullino juntamente com a AGROINNOVA pela oportunidade concedida de desenvolver o trabalho de tese em seu laboratório/casa-de-vegetação;

Ao Dr. Federico Tinivella pela orientação no desenvolvimento dos trabalhos, compreensão, paciência e incentivo nos momentos de incertezas;

Aos Professores Doutores Carlo Grignani, Dario Sacco e Luisella Celi e aos colegas Stefano e Federico da UNITO, que me receberam de braços abertos e me ajudaram sem medir esforços durante a minha estada;

A todo grupo do Laboratório de Patologia Vegetal da DiVaPRA - UNITO, em especial a Renata, Laura, Domenico e Gianna, pelo auxílio no laboratório; Guido, Gabrielle e Alessandro da casa-de-vegetação pelo apoio na condução dos experimentos, e acima de tudo pela amizade;

Aos colegas Carolina, Elaine e Raphael, pelo bom convívio durante o curso, em especial a Hellen pela grande amizade que se fortaleceu ao longo desses anos, e Cassiano pelo apoio e companheirismo;

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia da UFGD;

E a todos que direta ou indiretamente me apoiaram para a conclusão deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE QUADROS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Regulamentação do uso de sementes e mudas na agricultura orgânica.....	4
2.2. Tratamento de sementes.....	5
2.2.1. Controle biológico.....	5
2.2.2. Indutores de resistência.....	7
2.2.3. Métodos físicos.....	8
2.2.4. Associação de métodos físicos e controle biológico.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	12
3.1 Detecção de <i>Ascochyta pisi</i> em sementes de ervilha..	12
3.2. Tratamento de sementes com biofungicidas comerciais.....	13
3.3. Montagem e avaliação dos experimentos.....	14
3.4. Tratamento de sementes com microrganismos cultivados em laboratório e extratos vegetais.....	15
3.5. Tratamento de sementes com indutores de resistência.....	18
3.6. Tratamento de sementes com métodos físicos.....	19
3.7. Tratamento de sementes com associação de métodos físicos e controle biológico.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5. CONCLUSÃO.....	33
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
APÊNDICE.....	40

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1 Biofungicidas comerciais e testemunhas com e sem tratamento em sementes de ervilha e dose recomendada.....	13
Quadro 2 Agentes biológicos cultivados em laboratório, extratos vegetais e testemunhas, e seus respectivos fornecedores, utilizados no tratamento de sementes de ervilha.....	16
Quadro 3 Indutores de resistência, extratos vegetais, testemunhas e dose recomendada para tratamento de sementes de ervilha.....	18
Quadro 4 Métodos físicos e testemunhas com e sem tratamento, utilizado para tratamento de sementes de ervilha.....	19
Quadro 5 Tratamento de sementes de ervilha com associação de métodos físicos e agentes biológicos e as testemunhas.....	21

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1	Classes de infecção de (1 a 5), e zero na ausência de lesões, em sementes de ervilha..... 14
Figura 2	Seqüência de tratamento com elétrons de baixa energia; (A) fluxo de sementes passando pelo gerador de elétrons, (B) camada externa (tegumento) da semente tratada com elétrons (C) semente tratada sem dano ao embrião..... 20
Figura 3	Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com biofungicidas comerciais, duas semanas após a semeadura..... 23
Figura 4	Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com microrganismos cultivados em laboratório, duas semanas após a semeadura..... 25
Figura 5	Sementes de ervilha tratadas com farinha de mostarda..... 27
Figura 6	Fitotoxidez ocasionada pela aplicação de farinha de mostarda as sementes, caracterizada pela necrose do tegumento em sementes de ervilha. Duas semanas após a semeadura..... 27
Figura 7	Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com indutores de resistência, duas semanas após a semeadura..... 28
Figura 8	Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com métodos físicos, duas semanas após a semeadura..... 30
Figura 9	Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com a associação de métodos físicos e controle biológico, duas semanas após a semeadura..... 32

TRATAMENTO DE SEMENTES DE ERVILHA PARA O CONTROLE DE *Ascochyta pisi* EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO ORGÂNICA

Autora: Lucia Mayumi Hirata
Orientador: Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni

RESUMO

A ervilha apresenta alto valor nutritivo, e pode ser utilizada na alimentação humana e também na alimentação animal. Uma das doenças mais importante que ocorre na cultura da ervilha é causada pelo patógeno *Ascochyta pisi*, que é favorecida por temperaturas amenas e umidade elevada, e, podendo ser transmitida por sementes infectadas. Com a crescente procura por produtos mais saudáveis e sem o uso de defensivos químicos, o sistema de produção orgânico apresenta-se em expansão. O trabalho avaliou a eficácia dos tratamentos de sementes de ervilha no controle de *A. pisi* de acordo com o sistema orgânico. Foram testados biofungicidas comerciais, microrganismos cultivados em laboratório e extratos vegetais, indutores de resistência, métodos físicos baseados na termoterapia (vapor aerado e água aquecida), e elétrons de baixa energia e a associação dos tratamentos físicos e controle biológico, num total de cinco experimentos. Utilizaram-se sementes de ervilha naturalmente infectadas por *Ascochyta pisi*, semeadas em substrato orgânico comercial esterilizado e mantidas em casa-de-vegetação. Avaliaram-se emergência e índice de infecção duas semanas após a semeadura. O índice de infecção das plantas foi calculado em diferentes classes de infecção de acordo com Townsend-Heuberger, (1943). Extrato vegetal de *Thymus vulgaris*, *Clonostachys rosea* IK 726 e Micosat (*Glomus* sp. + *Pseudomonas fluorescens* + *P. borealis* + *Bacillus subtilis*), e a associação de tratamento físico com elétrons de baixa energia a 130 e 140 kV com o agente biológico *Bacillus subtilis* (Serenade) proporcionaram níveis de controle equivalentes ao tratamento químico.

Palavras-chave: controle físico; *Pisum sativum*; controle biológico.

***Ascochyta pisi* CONTROL THROUGH PEA SEED TREATMENTS FOR ORGANIC PRODUCTION**

Author: Lucia Mayumi Hirata
Adviser: Prof. Dr. Walber Luiz Gavassoni

ABSTRACT

Pea (*Pisum sativum* L.) which has a wide variety of uses, due to the high nutritional value, can be used for animal feeding as well as food source for humans. *Ascochyta* blight disease is one of the most devastating diseases of this leguminous crop and is favored by cool climate associated with high relative humidity. The pathogen can be transmitted by infected seeds. With the increasing demand for healthier products without the use of chemical, the organic system of production is in expansion. The effectiveness of seed treatments, accepted by organic regulations, against *A. pisi* was evaluated. The treatments consisted of commercial biofungicides, experimental formulations based on microorganisms cultivated in laboratory and vegetal extracts, resistance inducers, physical methods based in the thermotherapy (aerated steam and hot water), and low energy electrons and the association of the physical methods and biological agents had in five experiments. Pea seeds, naturally infected with *A. pisi* were sown in sterilized commercial organic substrate and maintained under greenhouse conditions. Plant emergence and infection index were evaluated two weeks after sowing. Extract of *Thymus vulgaris*, *Clonostachys rosea* IK 726, the commercial product Micosat (*Glomus* sp. + *Pseudomonas fluorescens* + *P. borealis* + *Bacillus subtilis*), and the association of physical method with low energy electrons 140 and 130 kV with biological agent *Bacillus subtilis* (Serenade) were as effective in suppressing *A. pisi* as the standard chemicals used as controls.

Keywords: physical control; *Pisum sativum*; biological control.

1 INTRODUÇÃO

A ervilha (*Pisum sativum* L.), planta pertencente à família *Fabaceae* é originária de regiões de clima temperado; tem como centro de origem o Oriente Médio, Índia, Afeganistão e Etiópia. A introdução da ervilha como alimento humano teria sido feito nos domínios do Império Romano e Grego em épocas pré-cristãs por povos nômades (Couto, 1989).

A introdução da ervilha no Brasil foi pelos colonizadores portugueses no Rio Grande do Sul. Somente no ano de 1955 a cultura passou a ser pesquisada em termos de melhoramento genético (Couto, 1989).

Conforme Sharma e Fonseca (2000), a ervilha apresenta alto valor nutritivo, e pode ser utilizada na alimentação humana, na forma de grãos (verdes ou secos reidratados), na alimentação animal e como adubo verde. Segundo Grosiean (1985), citados por Tomm e Lima (2000), no Canadá e na Europa o uso da ervilha como fonte protéica é muito difundido e os grãos são utilizados na formulação de rações.

No Brasil, a área cultivada e a produção têm oscilado muito ao longo dos anos (Filgueira, 2003). Segundo o IBGE (2003), o Brasil cultiva uma área de 2.427 ha de ervilha, com uma produção de aproximadamente 6.388 toneladas, e produtividade média de 2.633 kg/ha. A área cultivada no Brasil é pequena se comparada com a da Itália, que cultiva 11.322,80 ha de ervilha (politicheagricole, 2001).

Dentre as doenças fúngicas, a *Ascochyta pisi*, agente causal da mancha de ascochyta ou ascoquitose se destaca, atacando em pré-emergência, e, em todos os seus estádios vegetativos e reprodutivos. Dependendo da incidência, pode ocorrer necrose

da parte aérea; se a infecção ocorrer em vagens novas, há formação de cancrios escuros podendo atingir as sementes; quando o ataque é verificado em vagens mais velhas, nota-se o aparecimento de picnídios do patógeno associados às lesões (Stangarlin *et al.*, 2005).

A doença é favorecida por alta umidade do ar (acima de 80%) e temperatura abaixo de 23 °C, podendo vir a causar sérios problemas em condições de inverno chuvoso (Stangarlin *et al.*, 2005). Geralmente este patógeno se encontra associado a outros patógenos como *Ascochyta pinodes* e *Ascochyta pinodella*, que, em conjunto, eles causam o complexo de ascochyta, o qual é responsável por perdas de até 50% em lavouras no Canadá (Wang *et al.*, 2000).

As sementes infectadas constituem os principais agentes disseminadores de *Ascochyta pisi* para áreas onde a doença ainda não ocorre (Pierobom e Del Ponte, 2005). O tratamento de sementes com fungicidas pode impedir a introdução do patógeno na área, sendo uma das principais estratégias de controle da doença, reduzindo o inóculo inicial do patógeno.

Porém, considerando que no sistema de produção orgânica, as sementes devem ser produzidas sem a utilização de fungicidas, então, o tratamento de sementes visando o controle de fitopatógenos deve ser realizado mediante a utilização de agentes biológicos e métodos físicos, isolados ou associados.

A crescente preocupação com o meio ambiente e questões relacionadas à saúde humana têm impulsionado a expansão do sistema de produção orgânica. Apesar de encontrar-se em franca expansão, há carência de informações, assistência técnica, dados de pesquisa que viabilize o controle de pragas e doenças, fertilizantes, produtos para o controle de pragas e plantas invasoras e, principalmente, produtos para o tratamento de sementes, uma vez que muitos dos patógenos se encontram associados às sementes (Melo, 1998).

Segundo a EMBRAPA-CNPAB (2003), no Brasil ainda não há dados oficiais sobre a área manejada organicamente, e, a estimativa atual é de 170 mil ha de área cultivada e 672 mil ha de pastagens certificadas.

Percebe-se que em outras regiões do mundo, o sistema de produção orgânico vem crescendo; por exemplo, na Itália a agricultura orgânica abrange 954.361 ha, sendo 191.311 ha destinados ao cultivo de cereais (politicheagricole, 2004). Na Áustria e Suíça, a agricultura orgânica representa 10% do sistema de alimentação. Na Alemanha e

França, o governo obriga os agricultores a adotarem técnicas orgânicas, subvencionando-os, para que as utilizem como solução aos problemas de contaminação da água. Nos Estados Unidos, Japão e Singapura, registraram-se taxas anuais crescentes superiores a 20% em áreas de produção orgânica (FAO, 1999).

Este trabalho teve como objetivo testar a eficácia dos tratamentos baseados em microrganismos (comercializados ou cultivados em laboratório), extratos de plantas, agentes indutores de resistência e métodos físicos no controle do fungo patogênico *Ascochyta pisi* associado a sementes de ervilha.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A agricultura mundial teve um avanço significativo nas décadas de 60 e 70 com a chamada "Revolução Verde", quando a adoção de novas práticas agrícolas incluindo variedades com alto potencial de produção proporcionou a produção mundial de alimentos. Porém, reflexos negativos destas práticas começaram a ser notados ainda nos anos 70. Desde então, práticas agrícolas menos agressivas ao ambiente vêm sendo experimentadas e adotadas, principalmente na Europa, em atendimento à emergente demanda por alimentos saudáveis, livres de resíduos tóxicos e com qualidade ecológica. Surgiram, assim, os sistemas alternativos para a produção de alimentos (Neves *et al.*, 2000).

O movimento da agricultura orgânica no Brasil se fortaleceu após o II Encontro de Agricultura Alternativa, que ocorreu em 1984 em Petrópolis-RJ (Neves *et al.*, 2000). Apesar de encontrar-se em expansão, há uma carência de informações para o manejo adequado de doenças de plantas, incluindo o tratamento de sementes.

2.1 Regulamentação do uso de sementes e mudas na agricultura orgânica

A legislação europeia veta os produtores orgânicos a utilizarem sementes, e outros materiais vegetais propagativos, oriundos/produzidos via agricultura convencional (Council Regulation EEC (Comunidade Econômica Européia) N° 2092/91).

No Brasil, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento, mediante Instrução Normativa N° 7, de 17 de maio de 1999 (Ministério da Agricultura e do Abastecimento,

1999), adotou o padrão europeu para regulamentar as atividades relacionadas ao sistema de produção de agricultura orgânica. Entretanto, no referido documento houve a previsão de que, não havendo disponibilidade de sementes e material propagativos produzido via sistema de produção orgânica, o produtor orgânico fica autorizado a utilizar sementes oriundas de sistema de produção convencional, desde que avaliada pela instituição certificadora.

2.2 Tratamento de sementes

O sucesso de implantação de uma cultura depende em grande parte da qualidade da semente, que entre outros fatores, deve estar livre de patógenos, uma vez que pode se tornar fonte de disseminação, perpetuação e introdução dos mesmos, e, que podem atacar desde a fase de germinação até nas fases posteriores de desenvolvimento da planta (Roberti e Lugaresi, 2002).

O tratamento de sementes, no sentido amplo, envolve a aplicação de diversos processos e substâncias, objetivando preservar ou melhorar seu desempenho e assegurar a produtividade das plantas. No sentido restrito e mais tradicional, tratamento de sementes visa, exclusivamente, o controle de agentes causais de doenças que interferem na produtividade das plantas cultivadas (Menten, 1996). Neste sentido, o tratamento de sementes visando o controle de patógenos é uma das técnicas mais utilizadas na agricultura moderna. A sua eficiência depende, basicamente, do tipo e localização do patógeno-alvo, do vigor da semente e da existência de substâncias ou processos eficazes para o tratamento (Menten, 1995).

Os tipos de tratamento de sementes visando o controle de fitopatógenos podem ser: químico, biológico e físico (Machado, 1988). Devido a referências descrevendo a indução de resistência sistêmica de plantas por microrganismos aplicados a sementes, há razões para supor que indutores de resistência também sejam eficazes contra patógenos de sementes (STOVE, 2002).

2.2.1 Controle biológico

O controle biológico baseia-se na ação exercida por determinados microrganismos, que eliminam, impedem ou reduzem o desenvolvimento de patógenos

transportados pelas sementes ou existentes no solo, existindo a possibilidade de haver uma indução de resistência contra os patógenos da parte aérea (Menten, 1995).

O uso de agentes de biocontrole ou biopesticidas, para controle de doenças de plantas pode não ser mais eficaz do que outros métodos de controle, porém é comumente incentivado por razões ambientais (Cook, 1993). Além dos aspectos ecológicos, o desenvolvimento de produtos biológicos amplia as opções de controle das doenças de plantas (Kilian *et al.*, 2000).

Bactérias antagonistas apresentam-se como alternativa promissora à prática de controle químico disponível e têm um grande mercado em potencial para o manejo de doenças (Wang *et al.*, 2003). Em controle biológico, os antagonistas são agentes biológicos com o potencial de interferir negativamente no ciclo de vida dos fitopatógenos (Cook e Baker, 1983).

Mecanismos diretos de controle biológico envolvem antibiose, competição por nutrientes ou nichos, e parasitismo ou predação. Antibiose é talvez o mecanismo mais estudado (Jacobsen e Backman, 1993). Fungos como: *Trichoderma* sp., *Gliocladium roseum*, *Gliocladium virens*, *Coniothyrium minitans*, *Pythium oligandrum*, *Penicillium* spp. têm sido descritos como potenciais agentes de biocontrole. Muitos desses agentes demonstram especialização em parasitar classes específicas de patógenos. Alguns fungos antagônicos têm sido relatados como parasitas de uma gama de patógenos que, no entanto, mostram-se mais efetivos em parasitar um grupo em particular (Melo, 1998).

O potencial uso de microrganismos e, a utilização de extratos vegetais no controle das doenças foliares têm sido relatados por diversos autores. Entretanto, para patógenos de sementes, são poucos os estudos referentes ao tema; principalmente quanto à identificação ou potencial para uso no tratamento de sementes (STOVE, 2002).

Muitas bactérias, incluindo *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, têm sido estudadas como agente de biocontrole para patógenos de plantas (Wang *et al.*, 2003). Segundo Jahn *et al.* (2005b), o tratamento de sementes de brássicas com *P. chlororaphis* reduziu a infecção por *Alternaria* spp. em 75%, o mesmo nível proporcionado pelo tratamento químico com fungicidas.

Estudos preliminares de controle biológico em sementes mostraram-se eficientes contra patógenos causadores de tombamento. Sementes de soja de cultivares suscetíveis tratadas com *B. cereus* e semeadas em solo infestado por *Phytophthora*

sojae, propiciou rendimento significativo. Quanto à emergência de plantas, o tratamento de sementes de soja com *B. cereus* mostrou-se equivalente ao tratamento químico (Osburn *et al.*, 1995). Em solos infestados naturalmente com *Pythium* spp., o tratamento de sementes de grão de bico com *P. fluorescens*, resultou em rendimento semelhante ao obtido por métodos convencionais (Trapero-Casas *et al.*, 1990).

A eficiência de tratamentos baseados na utilização de *P. chlororaphis* e *P. fluorescens* na supressão de doenças também foi estudada. Testes *in vitro* demonstraram que *P. chlororaphis* reduziu em 100% a incidência de *Tilletia caries* em sementes de cevada. Em sementes de cevada infectadas com *Drechslera teres*, o efeito do tratamento com *P. chlororaphis* foi equivalente ao tratamento químico. *Pseudomonas fluorescens* reduziu em 79% a incidência de *Microdochium nivale* em sementes de trigo (Hökeberg *et al.*, 1997).

Um número crescente de relatos evidencia a influência do fungo *Clonostachys rosea* como um antagonista de ampla gama de fungos fitopatogênicos. O mecanismo pelo qual *C. rosea* exerce ação antagonista sobre outros fungos ainda não foi esclarecida (Lübeck *et al.*, 2002).

2.2.2 Indutores de resistência

As plantas dispõem de uma ampla variedade de mecanismos de defesa para se defender efetivamente da invasão de microrganismos. Estes mecanismos incluem barreiras químicas e físicas pré-existentes, tanto quanto respostas de defesa induzidas que se tornam ativas após a infecção do patógeno, assim como síntese de fitoalexinas, modificações da parede celular, e a produção de proteínas antifúngicas (Jackson e Taylor, 1996).

Quando os patógenos infectam as plantas, eles podem induzir um amplo espectro de resistência sistêmica para subsequente infecção pelo mesmo patógeno ou um outro. De acordo com a patogênese, o ácido salicílico acumula na célula da planta e promove a produção de proteínas relacionadas à patogênese, assim como β -1,3 glucanase e quitinase, que são capazes de degradar paredes celulares de fungos e bactérias (Mauch *et al.*, 1988).

A resistência induzida em plantas envolve a ativação dos mecanismos latentes de resistência em uma planta através de tratamento com agentes bióticos (Madamanchi e Kuc, 1991, citados por Pascholati e Leite, 1995) e abióticos (Kessmann *et al.*, 1994,

citados por Pascholati e Leite, 1995). Esse mecanismo de defesa é desencadeado, na maioria das vezes, por patógenos que causam necrose nos tecidos vegetais (Ryals *et al.*, 1996).

A resistência sistêmica adquirida implica na produção de vários sinais que são translocados, estes são envolvidos na ativação de mecanismos de resistência em partes distantes do ponto de ativação (Mauch-Mani e Métraux, 1998). O primeiro contato entre um indutor de resistência e uma planta induzirá a planta a resistir aos subseqüentes ataques. Os hormônios de plantas, ácido salicílico e ácido jasmônico, representam papéis chaves na regulação de respostas de defesa (Ton *et al.*, 2002).

O agente indutor de resistência acibenzolar-S-methyl foi lançado em 2001 como um ativador de plantas. No Brasil, o Ministério da Agricultura já concedeu registro ao produto com o princípio ativo acibenzolar-S-methyl (Bion WG), o qual é recomendado para aplicações sob forma de pulverizações às culturas de tomate, cacau e citros (Agrofit, 2005). O acibenzolar-S-methyl não apresenta atividade direta tóxica sobre fungos e bactérias fitopatogênicas. Porém, as plantas hospedeiras são protegidas contra os patógenos, mediante resistência sistêmica adquirida induzida pelo composto (Ishii *et al.*, 1999).

A aplicação de indutores de resistência via tratamento de sementes tem sido objeto de pesquisas recentes. A eficácia dos indutores de resistência no tratamento de sementes no patossistema feijão x *Colletotrichum lindemuthianum*, foram avaliadas em casa-de-vegetação por Jahn *et al.*, (2005b). Os indutores acibenzolar S-methyl, ácido salicílico, quitina e extrato de *Reynoutria sachalinensis*, resultaram em plantas sem sintomas de antracnose, enquanto que em plântulas obtidas a partir de sementes não tratadas a incidência foi de 10%.

2.2.3 Métodos físicos

O método físico de tratamento consiste na aplicação de diferentes formas de energia às sementes. Pode envolver diferentes tipos de irradiação, ou, o uso de tratamentos térmicos (Maude, 1966, citado por Forsberg, 2004). A termoterapia é a exposição das sementes ao calor. O princípio se baseia na sensibilidade diferencial entre patógenos e sementes às altas temperaturas, pela imersão das sementes em água aquecida, exposição ao ar quente ou pelo vapor aerado (Menten, 1995). O exemplo mais

simples e direto de tratamento térmico é a solarização, onde as sementes são aquecidas por radiação solar (Luthra e Sattar, 1934, citado por Forsberg, 2004).

O tratamento de sementes com energia solar é utilizado em países com o verão quente, em que a temperatura ao meio dia, durante o verão, atinge 40 °C ou mais. Este método tem sido utilizado com sucesso no controle do carvão causado por *Ustilago tritici*, em sementes de trigo e cevada, nas regiões do norte da Índia e Paquistão (Dhingra *et al.*, 1980). Outras técnicas de tratamento físico têm sido utilizadas, como água aquecida, a base de elétrons e mais recentemente o vapor aerado (Forsberg, 2004).

A termoterapia pode ser aplicada via calor úmido (água quente ou vapor) ou calor seco. O calor seco apresenta menor capacidade térmica ou troca de calor que a via úmida, requerendo, portanto, um maior tempo de exposição. Entretanto, é mais simples e mais acessível que o calor úmido, pois causa menores danos às sementes. A termoterapia via calor úmido ou vapor aerado pode causar o rompimento do tegumento e/ou extravasamento de substâncias das sementes, comum na embebição em água aquecida e vapor aerado (Menten, 1995). Relatos de uso prático de tratamento com vapor aerado para desinfecção de sementes com fungos são muito limitados (Forsberg, 2004).

A termoterapia pode muitas vezes causar danos à qualidade fisiológica das sementes como retardamento ou redução da germinação e do vigor. Além disso, a sua eficiência depende, em grande parte, do tipo e localização do patógeno alvo, do vigor da semente e da sua sensibilidade a temperaturas elevadas (Menten, 1995).

Em anos recentes, o método de tratamento de sementes por água aquecida tem sido utilizado, porém, ainda em pequena escala devido à carência de equipamentos comerciais, e a necessidade de secar as sementes, tornando esta opção economicamente inviável. Uma variação consiste na utilização do ar quente, onde a secagem das sementes é dispensável. A combinação desses tratamentos (água quente + calor seco) tem sido citada para sementes de cereais. A combinação destes métodos no controle de patógenos em sementes de hortaliças ainda necessita ser estudada (STOVE, 2002).

Nega *et al.* (2003), avaliando o efeito do tratamento com água aquecida em sementes de olerícolas, observaram que a imersão das sementes a 50 °C/30 minutos e 53 °C/10 minutos reduziram drasticamente a presença de *Alternaria* spp. em sementes de cenoura, de 85 e 98%, respectivamente. Para tratamento em sementes de brássicas, água aquecida a 50 °C por 25 e 30 minutos reduziram a incidência de *Phoma lingam* de 87%

e 92%, respectivamente, enquanto que a 53 °C/10 minutos, *Alternaria brassicola* foi reduzida em até 99%, porém, não se avaliou a emergência de plântulas, mas observou-se um efeito significativo na redução de plântulas emergidas.

A utilização de elétrons de baixa energia no tratamento de sementes representa um método de tratamento de sementes completamente novo. Assim, existem poucos estudos referentes ao assunto. A necessidade de restringir o efeito dos elétrons para outras camadas da semente é o principal fator para determinar o uso deste método (Jahn e Puls, 1998).

Estudos recentes do projeto STOVE (Seed Treatments for Organic Vegetable Production), realizados por Jahn *et al.* (2005a), obtiveram resultados promissores quanto ao uso de tratamentos não-químicos, diferenciando de acordo com o patossistema. Em sementes com alta infecção de patógenos, os métodos físicos (água aquecida, elétrons de baixa energia e vapor aerado) foram eficientes e reduziram a incidência do patógeno no patossistema cenoura - *Alternaria dauci* em até 70%; no patossistema feijão - *Colletotrichum lindemuthianum* em 25%; e em 30% no patossistema salsa - *Septoria petroselini*. Bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas* também foram controladas nas culturas de cenoura e brássicas.

2.2.4 Associação de métodos físicos e controle biológico

A associação de tratamento físico com elétrons de baixa energia a 50 kV/10 kGy¹, e biológico com *Pseudomonas fluorescens*, em sementes de cenoura infectadas com *Alternaria* spp., semeadas em solo não infestado, proporcionaram aumento na emergência e no peso fresco da planta. Quando foi realizado apenas o tratamento biológico, o resultado foi superior à aplicação de elétrons de baixa energia. Em solos infestados com *Rhizoctonia solani*, tratamentos com elétrons de baixa energia acentuaram os problemas, reduzindo a emergência e peso fresco das plantas (Jahn e Puls, 1998).

Em condições a campo, tratamento de sementes de cenoura com elétrons a 60 kV/10 kGy melhorou significativamente a emergência. Enquanto que as sementes de cenoura tratadas com suspensão de *P. fluorescens* tiveram um aumento no rendimento. Porém, os melhores resultados foram obtidos com as sementes tratadas com elétrons a

¹ kV: quilo volt: 1000 volts.

kGy (quilo Gray): 1000 Gy. 1Gy: 1 joule/kg. Gy: dose de radiação absorvida por unidade de massa.

60kV/10kGy e semeadas em solo encharcado com a referida suspensão antagônica, que apresentava 10^9 cfu/mL, aplicado em 2 metros de linha de semeadura (Jahn e Puls, 1998).

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Università degli Studi di Torino, no Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali – Patologia Vegetale, Torino, Itália, no período de Fevereiro a Agosto de 2005. Experimentos foram conduzidos em laboratório e casa-de-vegetação. Foram utilizadas sementes de ervilha (*Pisum sativum*) “Variety wix” provenientes da Institute for Biological Control – Alemanha, infectadas naturalmente com o patógeno *Ascochyta pisi*.

A eficiência do tratamento de sementes de ervilha com biofungicidas, microrganismos cultivados em laboratório e extratos vegetais, indutores de resistência, métodos físicos e a associação dos métodos físicos e tratamento biológico em controlar *A. pisi* foi avaliada em cinco experimentos.

O delineamento da pesquisa experimental, em todos os experimentos, foi em blocos casualizados com quinze repetições, sendo que cada repetição constou de 10 plantas.

3.1 Detecção de *Ascochyta pisi* em sementes de ervilha

Amostra do lote de sementes foi examinada inicialmente quanto à presença do patógeno em placas de Petri com meio de cultura BDA+S (Apêndice-A1). Realizou-se a desinfecção superficial de 400 sementes com hipoclorito de sódio a 1% por um minuto, e lavadas em água corrente. Em cada placa de Petri foram plaqueadas 10 sementes de ervilha. As placas de Petri contendo as sementes de ervilha foram incubadas por 7 dias a

20 °C em escuro contínuo. Após o período, foi realizada a observação visual do desenvolvimento de micélio de *A. pisi* (Apêndice-A2).

Sementes da mesma amostra foram semeadas em substrato orgânico comercial esterilizado, em dez bandejas com 10 sementes, totalizando 100 sementes, mantidas em casa-de-vegetação. Duas semanas após a semeadura, as plantas foram retiradas e lavadas em água corrente para observação visual das lesões presentes no cotilédono/epicotilo, bem como o desenvolvimento da planta.

3.2 Tratamento de sementes com biofungicidas comerciais

Foram testadas seis formulações comerciais (biofungicidas) com propriedades antagonicas a fitopatógenos. No Quadro 1 se encontram os agentes microbianos comerciais, e os respectivos produtos bem como os tratamentos testemunhas utilizadas no experimento.

Quadro 1. Biofungicidas comerciais e testemunhas com e sem tratamento em sementes de ervilha e dose recomendada.

Tratamento - Produto	Dose (para 10g de sementes)
<i>Bacillus subtilis</i> - FZB 24®	100 mg
<i>Bacillus subtilis</i> - MBI 600®	100 mg
<i>Bacillus subtilis</i> - Serenade®	100 mg
<i>Fusarium oxysporum</i> 251/2	300 mg
<i>Pseudomonas chlororaphis</i> - BA 2552®	300 µl
<i>Streptomyces griseoviridis</i> - Mycostop Mix®	50 mg
Thiram	0,03 mg
Testemunha	---

Para aplicação dos tratamentos, 150 sementes foram acondicionadas em sacos plásticos e receberam o produto conforme o tratamento. Agitou-se por um minuto. Para produtos formulados pós (MBI 600, FZB 24, Serenade, F251/2 e Mycostop Mix), adicionou-se algumas gotas de água destilada, para que houvesse melhor aderência e uniformidade na cobertura das sementes pelo produto. O produto BA 2552, formulação líquida, foi aplicado diretamente sobre as sementes sem prévio umedecimento.

3.3 Montagem e avaliação dos experimentos

Em todos os experimentos foram adicionados os tratamentos testemunha com fungicida thiram 0,03mg e/ou procloraz (0,0045g/10g de sementes) e testemunha sem

tratamento a seco ou em água. Os produtos foram pesados e adicionados às sementes juntamente com algumas gotas de água, que colocadas em sacos plásticos foram agitadas por um minuto. A testemunha sem tratamento a seco foi utilizada quando os tratamentos se apresentavam na forma em pó, enquanto que a testemunha tratada com água destilada foi utilizada quando os produtos se apresentavam na forma líquida.

As sementes foram semeadas em vasos de polietileno (8 x 8 x 8,5 cm) em substrato orgânico comercial (esterilizado a temperatura de 90 °C por 20 minutos), e foram mantidas em casa de vegetação com temperatura em torno de 26 °C. A irrigação foi realizada de maneira que sempre mantivesse umidade suficiente nos vasos e o fotoperíodo regulado para 12 h luz/12 h escuro.

Duas semanas após a semeadura (Apêndice-A3), realizaram-se as avaliações quanto à emergência das plantas e quanto à eficácia do tratamento no controle de *A. pisi*. As plantas foram retiradas do vaso e lavadas em água corrente e avaliadas mediante observação visual de acordo com as lesões.

As plantas de ervilha foram classificadas conforme Institute for Biological Control em diferentes classes de infecção, de 1 a 5, de acordo com a presença do patógeno, como ilustra a Figura 1, e conforme descrição.



Figura 1. Classes de infecção de (1 a 5), e zero na ausência de lesões, em sementes de ervilha de acordo com Institute for Biological Control, Darmstadt, Alemanha, 2005².

- 0 - ausência de lesões;
- 1 - lesões cobrindo até 15% do cotilédono;
- 2 - lesões cobrindo até 50% do cotilédono;

² Comunicação pessoal em 24/03/05 do Dr. Federico Tinivella, Agroinnova – UNITO, Torino – Itália.

- 3 - lesões cobrindo 100% do cotilédone;
- 4 - lesões se estendem à região basal do epicótilo e;
- 5 - epicótilo totalmente lesionado.

Foi calculado o índice de infecção segundo Townsend e Heuberger (1943),
 $= (\sum (n*v) / (i*N))*100$; onde:

v: classe de infecção;

i: maior classe de infecção (5 neste caso);

n: número de plantas em cada classe;

N: quantidade total de plantas.

Para análise estatística, os dados foram transformados em arco seno raíz quadrada de $x/100$ e em seguida submetidos à análise de variância através do programa estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 Tratamento de sementes com microrganismos cultivados em laboratório e extratos vegetais

Foram testados dezesseis microrganismos cultivados em laboratório, e dois extratos vegetais com provável propriedade antagonista a fitopatógenos. No Quadro 2 pode-se observar a denominação dos isolados e extratos vegetais, e a instituição fornecedora dos mesmos.

As bactérias antagonistas foram preparadas a partir do isolado mantido em tubos com meio de cultura NYDA (Apêndice-A1). Do tubo, retirou-se pequena porção e repicou-se em 250 mL de meio de cultura NYDB esterilizado (Apêndice-A1) contidas em Erlenmeyers. As culturas foram mantidas em agitadores por 48 horas no escuro à temperatura ambiente. Após o período, as sementes de cada tratamento foram imersas na suspensão bacteriana e agitadas por 15 minutos. As sementes foram, então, removidas, drenadas e enxutas à temperatura ambiente sobre papel toalha, por uma noite, e semeadas no dia seguinte.

Quadro 2. Agentes biológicos cultivados em laboratório, extratos vegetais e testemunhas e seus respectivos fornecedores, utilizados no tratamento de sementes de ervilha.

Fornecedor	Agente	Isolado/Produto
------------	--------	-----------------

Agroinnova, Torino, Itália	Bactéria isolada de semente/rizosfera de milho	RG 11
“	Bactéria isolada de semente/rizosfera de milho	RG 6
“	Bactéria isolada de semente/rizosfera de milho	RG 68
“	<i>Curtobacterium</i> sp.	R 11
“	<i>Fusarium oxysporum</i>	MSA35
“	<i>Pichia guilliermondii</i>	M 8
BBA ¹ , Darmstadt, Alemanha	<i>Pseudomonas putida</i>	E 183
“	<i>Pseudomonas</i> sp.	I 112
“	<i>Trichoderma viride</i>	T 69039
CCS ² , Aosta, Itália	<i>Glomus</i> sp + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. borealis</i> + <i>B. subtilis</i>	Micosat
Dr. Schaette AG, Alemanha	84,8% de farinha de mostarda	Tillecur®
KVL ³ , Copenhagen, Dinamarca	<i>Clonostachys rosea</i>	IK 726
PRI ⁴ , Wageningen, Holanda	<i>Thymus vulgaris</i>	Óleo de Tomilho
SLU ⁵ , Uppsala, Suécia	<i>Bacillus</i> sp.	SLU 3
“	<i>Burkholderia pickettii</i>	SLU 1
“	<i>Pseudomonas putida</i>	SLU 2
“	<i>Pseudomonas putida</i>	SLU 5
“	<i>Pseudomonas</i> sp.	SLU 4
Thiram	---	---
Procloraz	---	---
Testemunha	---	---

¹BBA: Federal Biological Research Centre for Agriculture and Forestry

²CCS: Centro Colturale Sperimentale

³KVL: The Royal Veterinary and Agricultural University-Department of Plant Biology

⁴PRI: Plant Research International

⁵SLU: Swedish Agricultural University

O fungo *Fusarium oxysporum* MSA 35 foi preparado a partir da retirada de um pequeno fragmento do isolado mantido em meio BDA+S, e repicado para 250 mL de meio de cultura caseína hidrolisada (Apêndice-A1). Após a repicagem, o Erlenmeyer foi levado para o agitador e mantido por 11 dias no escuro, à temperatura ambiente. A concentração do inóculo foi diluída e ajustada a 1×10^6 UFC/mL, utilizando-se a câmara Bürker para a contagem do número de unidades formadoras de colônias (Apêndice-A4). As sementes foram imersas na suspensão fúngica e levadas novamente para agitadores e mantidas por 15 minutos. Decorridos os 15 minutos, as sementes foram drenadas e enxutas a temperatura ambiente, por uma noite sob papel toalha. No dia seguinte, as sementes foram semeadas.

O fungo *Trichoderma viride* T 69039, foi preparado a partir da repicagem e multiplicação em meio de cultura BDA+S e mantido por 10 dias, em condições de

temperatura ambiente até que ocorresse a esporulação. Os esporos da superfície do meio de cultura foram retirados com o auxílio de uma espátula de vidro, para facilitar sua retirada usaram-se algumas gotas de água destilada. A suspensão fúngica foi ajustada a 1×10^6 UFC/mL, e foi então adicionada as sementes. Agitou-se por 15 minutos, após este período, procedeu-se conforme descrito para *F. oxysporum* MSA 35.

Para o tratamento com *Clonostachys rosea* isolado IK 726, 1,5 gramas do antagonista na formulação a base de argila em pó molhável foi adicionado a 10 mL de água estéril. Para tratar as sementes foi necessário que este estivesse na concentração de 4:1 (volume de água e peso de sementes). Sendo assim, a quantidade de 150 sementes foi pesada para se ter o peso das mesmas, e posteriormente obter o volume de água necessário. Para tratar 40 g de sementes, foi necessário adicionar 160 mL de água para se obter a suspensão fúngica. As sementes foram misturadas ao tratamento e agitadas por 10 minutos, e posteriormente drenadas e enxutas mediante uso de papel toalha, para semear.

Para o tratamento com Tillecur®, comercializado na formulação em pó molhável, foi necessário dissolver o produto em água destilada na dose recomendada de 20%. O produto final é um composto líquido, e denso. Uma pequena quantidade do produto foi adicionada às sementes e agitadas em saco plástico. Para que as sementes ficassem enxutas e obter boa aderência do produto, foi adicionado talco inerte.

Para o tratamento com Micosat, 150 sementes colocadas em saco plástico receberam inicialmente o agente adesivo na quantidade de 2 mL para melhor cobertura do produto, e posteriormente foi adicionado o produto Micosat as sementes, na dose de 45 mg, e agitou-se as sementes. Para o tratamento com óleo de Tomilho, as sementes foram tratadas na dose de 0,1% pelo Institute for Biological Control – Alemanha.

3.5 Tratamento de sementes com indutores de resistência

Foram testadas sete substâncias com propriedades indutoras de resistência a fitopatógenos, sendo duas delas extratos vegetais. No Quadro 3 podem ser observados os tratamentos bem como a dose utilizada.

O tratamento Com Cat foi agitado em agitador magnético por 2 horas e posteriormente com um dispersor (sonication) por 5 minutos. Demais tratamentos foram dissolvidos cada um, em um litro de água destilada. As sementes foram colocadas em Beckers que receberam os tratamentos, de tal forma que todas as sementes fossem

cobertas, e, foram agitadas por uma hora em agitadores. O excesso de solução foi então drenado, com auxílio de uma peneira. As sementes foram então enxutas em papel toalha e semeadas.

Quadro 3. Indutores de resistência, extratos vegetais, testemunhas e dose recomendada para tratamento de sementes de ervilha.

Tratamento	Dose em água
8% extrato de <i>Medicago sativa</i> , 15,5% K ₂ O - Kendal®	0,3%
Acibenzolar-S-methyl – Bion®	1,0 mg/L
Ácido jasmônico	1,0 mg/L
Ácido salicílico	10,0 mg/L
Esteróide vegetal - Com Cat	0,5 mg/L
Extrato de <i>Reynoutria sachalinensis</i> - Milsana®	1,0%
Quitina - Chitoplant	0,5%
Thiram	0,03 mg ¹
Testemunha	---

¹ Dose para 10 g de sementes.

3.6 Tratamento de sementes com métodos físicos

Foram testados cinco métodos físicos de tratamento de sementes. No Quadro 4, encontram-se os parâmetros utilizados no tratamento de sementes, como temperatura, tempo, umidade, voltagem e a dose absorvida.

Quadro 4. Métodos físicos e testemunhas com e sem tratamento utilizado para tratamento de sementes de ervilha.

Tratamento	Temp. (°C)	Tempo (min.)	Umidade (%)	Voltagem (kV) ¹	Dose absorvida (kGy) ²
Água aquecida	48	10	-	-	-
Elétrons	-	-	-	130	12
Elétrons	-	-	-	140	12
Vapor aerado	70	2	90	-	-
Vapor aerado	74	2	90	-	-
Thiram	-	-	-	-	-

Procloraz	-	-	-	-	-
Testemunha	-	-	-	-	-

¹ kV: quilo volt: 1000 volts

² kGy (quilo Gray):1000 Gy. 1Gy: 1joule/kg. Gy: dose de radiação absorvida por unidade de massa.

O tratamento em água aquecida foi realizado mediante imersão das sementes, de acordo com a temperatura e o tempo pré-estabelecido, conforme Nega *et al.*, (2003). Tal tratamento foi realizado pelo Nunhems Hild GmbH, Marbach, Alemanha.

O tratamento com elétrons de baixa energia foi realizado pelo sistema piloto *e⁻ ventus*, no Fraunhofer Institut für Elektronenstrahl und Plasmatechnik di Dresda (Alemanha). Seu princípio baseia-se na exposição à radiação (“cozimento”) das sementes, sem alteração de temperatura. Uma delgada camada do tegumento da semente é “cozida”, sendo estimada em torno de 30 a 200 micra (Jahn e Puls, 1998), como ilustra a Figura 2 e (Apêndice-A5).

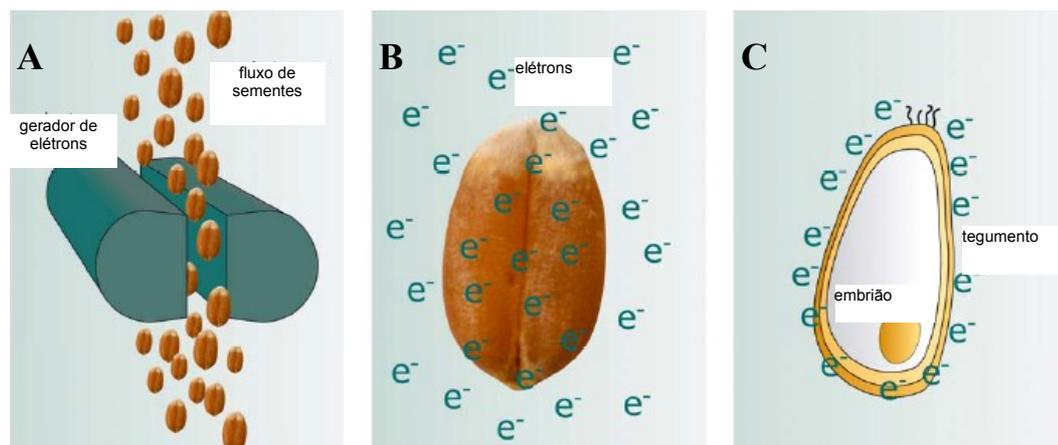


Figura 2. Sequência de tratamento com elétrons de baixa energia; (A) fluxo de sementes passando pelo gerador de elétrons, (B) camada externa (tegumento) da semente tratada com elétrons (C) semente tratada sem dano ao embrião (modificado de *e⁻ ventus*, 2005).

A aplicação do vapor aerado às sementes foi realizada mediante uso de equipamento desenvolvido e patenteado pela Acanova AB, Uppsala, Suécia. O princípio da técnica é descrito por Forsberg (2001), e consiste em três etapas, I. fase de aquecimento: as sementes passam rapidamente por temperatura e umidade elevadas. II. fase constante: por um período, os parâmetros físicos são mantidos constantes. III. fase de resfriamento: as sementes são resfriadas com ar seco e frio (Apêndice-A6 e A7).

3.7 Tratamento de sementes com associação de métodos físicos e controle biológico

Dentre os métodos físicos avaliados, os tratamentos de água aquecida a 48 °C e elétrons de baixa energia a 130 e a 140 kV, foram novamente avaliados em associação a agentes biológicos. No Quadro 5, encontram-se os tratamentos utilizados na associação dos métodos físicos e biológicos. Os tratamentos biológicos foram realizados conforme a metodologia descrita nos itens 3.2 e 3.4.

Quadro 5. Tratamento de sementes de ervilha com associação de métodos físicos e agentes biológicos e as testemunhas.

Tratamento físico	Tratamento biológico
Água aquecida a 48 °C	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)
Água aquecida a 48 °C	<i>Clonostachys rosea</i> IK 726
Água aquecida a 48 °C	<i>Glomus</i> sp. + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. borealis</i> + <i>B. subtilis</i> (Micosat)
Água aquecida a 48 °C	<i>Streptomyces griseoviridis</i> (Mycostop mix®)
Elétrons a 130 kV	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)
Elétrons a 130 kV	<i>Clonostachys rosea</i> IK 726
Elétrons a 130 kV	<i>Glomus</i> sp. + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. borealis</i> + <i>B. subtilis</i> (Micosat)
Elétrons a 130 kV	<i>Streptomyces griseoviridis</i> (Mycostop mix®)
Elétrons a 140 kV	<i>Bacillus subtilis</i> (Serenade®)
Elétrons a 140 kV	<i>Clonostachys rosea</i> IK 726
Elétrons a 140 kV	<i>Glomus</i> sp. + <i>P. fluorescens</i> + <i>P. borealis</i> + <i>B. subtilis</i> (Micosat)
Elétrons a 140 kV	<i>Streptomyces griseoviridis</i> (Mycostop mix®)
Thiram	----
Procloraz	----
Testemunha	----

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amostra de sementes de ervilha plaqueada em meio de cultura BDA+S, apresentou incidência de 38,3% de sementes infectadas.

O índice de infecção Townsend e Heuberger (1943) foi de 22,3% (Apêndice-A8). A incidência de plantas com sintomas visíveis foi de 64,0%.

Dentre as plantas emergidas em casa-de-vegetação, apenas 35 plantas apresentaram-se sadias, não apresentando sinais de *Ascochyta pisi*. Plantas que apresentavam sintomas da doença, num total de 62 plantas; as lesões variaram desde fase inicial (classe 1 de infecção) à fase mais avançada da doença (classe 5 de infecção). O método utilizado para avaliar as plantas em classe de infecção classifica as plantas baseando-se na intensidade de doença de cada planta.

A incidência de infecção variou de 38,3 para 64,0% quando realizada *in vitro* e em casa-de-vegetação, respectivamente. Quando da realização *in vitro* mesmo com condições ideais para o crescimento do fungo, a incidência foi menor do que em casa de vegetação. Tal fato pode ter sido desencadeado pelo estresse que a planta tenha sofrido, fazendo com que ele se torne mais vulnerável ao ataque do patógeno. Como também, a quantidade de sementes que foram avaliadas, sendo 400 sementes *in vitro*, enquanto que em casa-de-vegetação foram apenas 100 sementes, a partir da mesma amostra, o que poderia ter contribuído para a variação da resposta.

Na Figura 3, observa-se o efeito dos biofungicidas na emergência e infecção. Ao comparar os tratamentos com a testemunha não tratada, observa-se que nenhum biofungicida proporcionou redução na infecção das plantas por *A. pisi*. Em adição,

nenhum tratamento mostrou-se tão eficiente quanto o controle químico a base de thiram no controle do patógeno. Não foram detectados efeitos de tratamento sobre a emergência de plantas de ervilha.

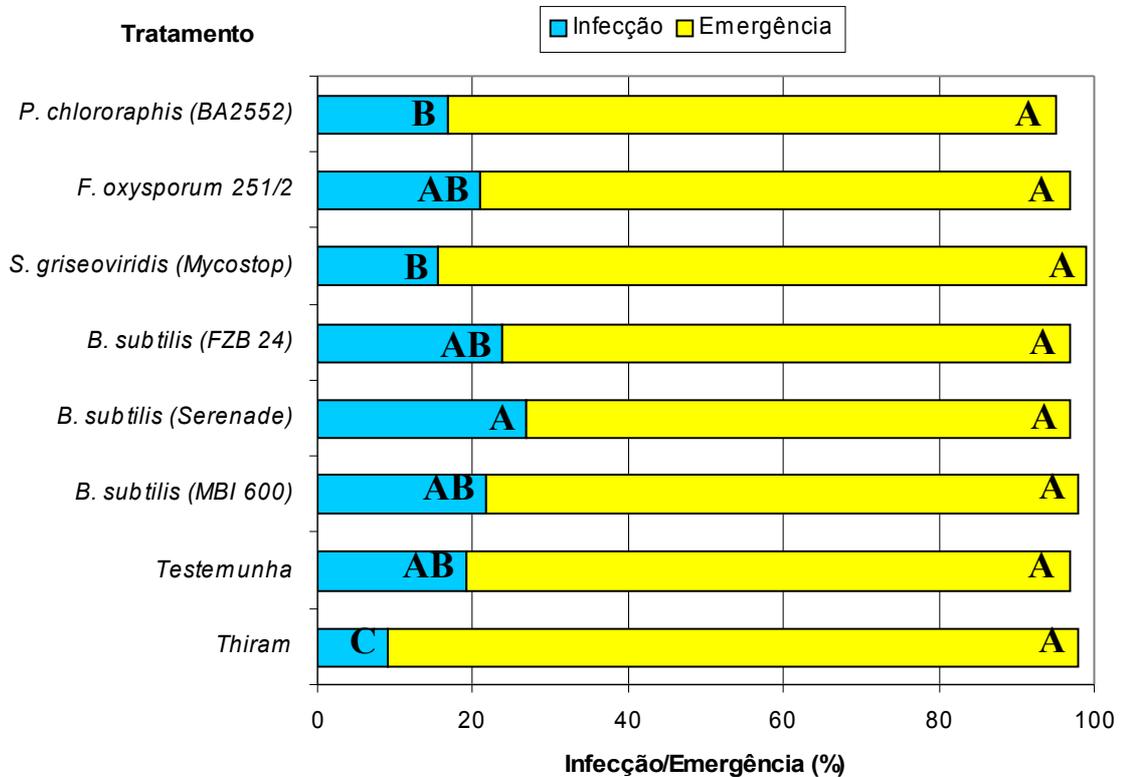


Figura 3. Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com biofungicidas comerciais, duas semanas após a semeadura. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey 5%).

Niranjan *et al.* (2003), utilizando rizobactérias promotoras de crescimento de plantas, em sementes de *Pennisetum glaucum* (milheto) em diferentes formas de aplicação, como tratamento de sementes e incorporação ao solo, observou que ao incorporar ao solo, as rizobactérias foram mais eficientes do que em tratamento de sementes, na redução de míldio, em condições a campo. Os mecanismos pelos quais as rizobactérias reduziram a incidência de míldio não foram estudados, mas acredita-se, que a resistência sistêmica induzida pode ter sido a causa, uma vez que as rizobactérias não apresentaram efeito tóxico sobre o patógeno *Sclerospora graminicola*.

Paulitz e Bélanger (2001) observaram dentre vários isolados de *Bacillus* spp. que o tratamento *B. subtilis* FZB 24, no patossistema *Phytophthora* sp.- tomateiro e *Pythium* sp.- pepineiro, em casa-de-vegetação, proporcionou resultado menos eficiente

que outras espécies de *Bacillus* não comerciais. Segundo os autores *B. subtilis* não apresenta atividade antifúngica.

Scherm *et al.* (2004), observaram que o produto comercial formulado com *B. subtilis* foi positivo no controle de *Monilinia vaccinii-corymbosi* quando aplicado nas flores de “blueberry”, resultando em menor taxa de crescimento de hifas.

Conforme Minuto *et al.* (1997), a eficácia do tratamento com *Fusarium oxysporum* 251/2 depende da forma como é aplicada. Quando o antagonista é aplicado ao solo houve uma diferença estatística significativa em plantas sadias de manjeriço, o mesmo não ocorreu quando o antagonista foi aplicado via tratamento de sementes. Porém, foi observado um efeito de incompatibilidade de produtos, pois, as sementes de ervilha tratadas com o agente *F. oxysporum* 251/2, apresentavam lesões muito semelhantes a lesões do patógeno *A. pisi*, o qual inicialmente pôde ser diferenciado pela coloração das lesões, onde *A. pisi* se caracteriza pela cor marrom intenso, enquanto que *F. oxysporum* é caracterizado pela coloração vermelha; que após isolamento, confirmou-se a presença do agente *F. oxysporum* 251/2. Entretanto, não se observou diferença visual como sinais ou coloração diferenciada, na parte aérea das plantas.

Quanto ao efeito do tratamento com o agente *Pseudomonas chlororaphis*, Johnsson *et al.* (1998), observaram que o isolado MA 342 foi muito eficiente contra alguns patógenos de solo e de sementes, dentre os patógenos controlados foram *Drechslera avenae*, *D. graminea*, *D. teres*, *Ustilago hordei*, *U. avenae* e contra o fungo de semente *Tilletia caries*. Os tratamentos biológicos apresentaram maior eficiência do que o tratamento fungicida. Porém, não elucidaram com detalhes o modo de ação dos antagonistas, afirmando que os antagonistas suprimem os patógenos pela produção de metabólitos antifúngicos com atividade de amplo espectro. No presente trabalho não se observou efeito supressor. Os mesmos autores observaram que os patógenos de sementes *Bipolaris sorokiniana* e *Microdochium nivale* não foram controlados pelos antagonistas, o qual depende da seletividade da doença e/ou via de infecção.

O efeito dos microrganismos cultivados em laboratório e extratos vegetais na emergência e infecção de plantas é apresentado na Figura 4.

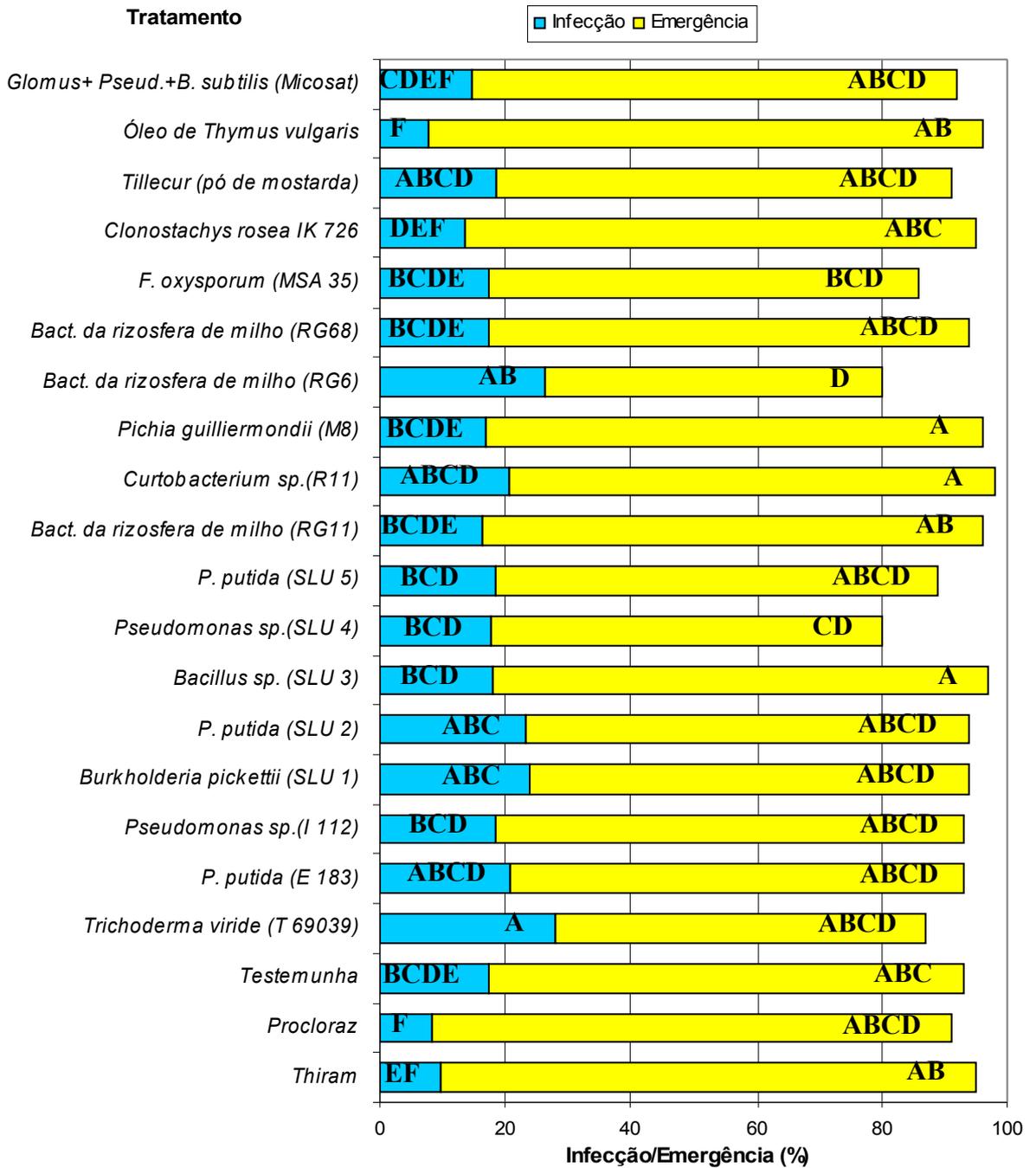


Figura 4. Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com microrganismos cultivados em laboratório, duas semanas após a semeadura. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey 5%).

Os tratamentos foram significativos na emergência de plantas, onde os isolados *Bacillus* sp. (SLU 3), *Curtobacterium* sp. (R11) e *Pichia guilliermondii* (M8) proporcionaram os melhores resultados, com germinação superior a 96%, mesmo este não sendo estatisticamente superior ao tratamento químico. Porém, observa-se também que o isolado de bactérias da rizosfera do milho (RG 6) não tem ação antagonista sobre o patógeno, ou até mesmo prejudica a fase de germinação, o qual foi de 80%, inferior ao tratamento testemunha sem aplicação de qualquer produto.

Quanto à infecção de plantas, também foi detectada diferença estatística entre os tratamentos. O tratamento com óleo de *Thymus vulgaris* proporcionou resultados equivalentes às testemunhas com os fungicidas procloraz e thiram. Sendo eficiente para o controle de *A. pisi*. Segundo Daferera *et al.* (2003), o óleo de *T. vulgaris* é caracterizado pela presença de substâncias que são fungitóxicas com ação sobre patógenos como *Botrytis cinerea* e *Fusarium* sp. Embora não tenha sido objeto deste experimento, é possível que o óleo *T. vulgaris* também apresente propriedades tóxicas contra *A. pisi*, uma vez que foi eficiente em reduzir o índice de infecção.

O tratamento com *Clonostachys rosea* IK 726, mostrou-se eficaz no controle do patógeno e também foi equivalente aos tratamentos químicos. Em estudos recentes realizados por Tinivella *et al.* (2004), para o patossistema cenoura - *Alternaria dauci* e *A. radicina* os tratamentos com isolados de *Pseudomonas* sp. (SLU4) e *Pseudomonas putida* (SLU 5) formulados em laboratório foram eficazes controlando ambos os patógenos, aumentando assim o número de plantas saudas. Tais resultados que não ocorreu neste patossistema ervilha - *A. pisi*. Porém em se tratando de isolados ainda na fase de experimentação, são poucos os trabalhos referentes aos mesmos.

O isolado *T. viride* (T 69039) proporcionou resultado muito inferior ao tratamento testemunha, não apresentando qualquer propriedade antagonista sobre o patógeno no índice de infecção. Embora o *Trichoderma* sp. seja eficaz no controle de inúmeros fungos fitopatogênicos, principalmente àqueles com estruturas de resistência consideradas difíceis de serem atacadas por microrganismos (Melo, 1998). Martins-Corder e Melo (1998), realizando testes de antibiose observou que isolados de *Trichoderma viride* produziram metabólitos que não permitiram o crescimento de *Verticillium dahliae* *in vitro*. O isolado T15P apresentou melhor resposta quanto à produção de metabólitos, visto que sua colônia, ao atingir cerca de 4,0 cm, mostrava

inibição completa do crescimento de *V. dahliae*. O mesmo não foi observado para o patógeno *A. pisi*.

O tratamento com o isolado *T. viride* (T 69039) não foi eficaz no controle do patógeno, resultando em maior infecção que o tratamento testemunha. Segundo Harman (1991), o agente *T. viride*, multiplica-se de maneira eficiente em solos com pH baixo na faixa de 4 a 5, e reduzindo o desenvolvimento de microrganismos competidores do solo. Tal fato poderia justificar a ausência de controle do patógeno pelo antagonista, uma vez que o substrato orgânico comercial utilizado não apresentava pH favorável ao crescimento do antagonista. O material utilizado apresentava pH em torno de 6,0.

O extrato vegetal de mostarda (Figura 5) (Tillecur®) provocou o aparecimento de fitotoxidez. Os sintomas caracterizavam pela presença de lesões nos cotilédones; essas lesões se apresentavam em toda a superfície da semente, como necrose do tegumento ocasionado pelo extrato vegetal (Figura 6).



Figura 5. Sementes de ervilha tratadas com farinha de mostarda.



Figura 6. Fitotoxidez ocasionada pela aplicação de farinha de mostarda as sementes, caracterizada pela necrose do tegumento em sementes de ervilha. Duas semanas após a semeadura.

Na Figura 7 encontram-se os resultados do efeito do tratamento de sementes de ervilha com indutores de resistência na emergência e na infecção de plantas.

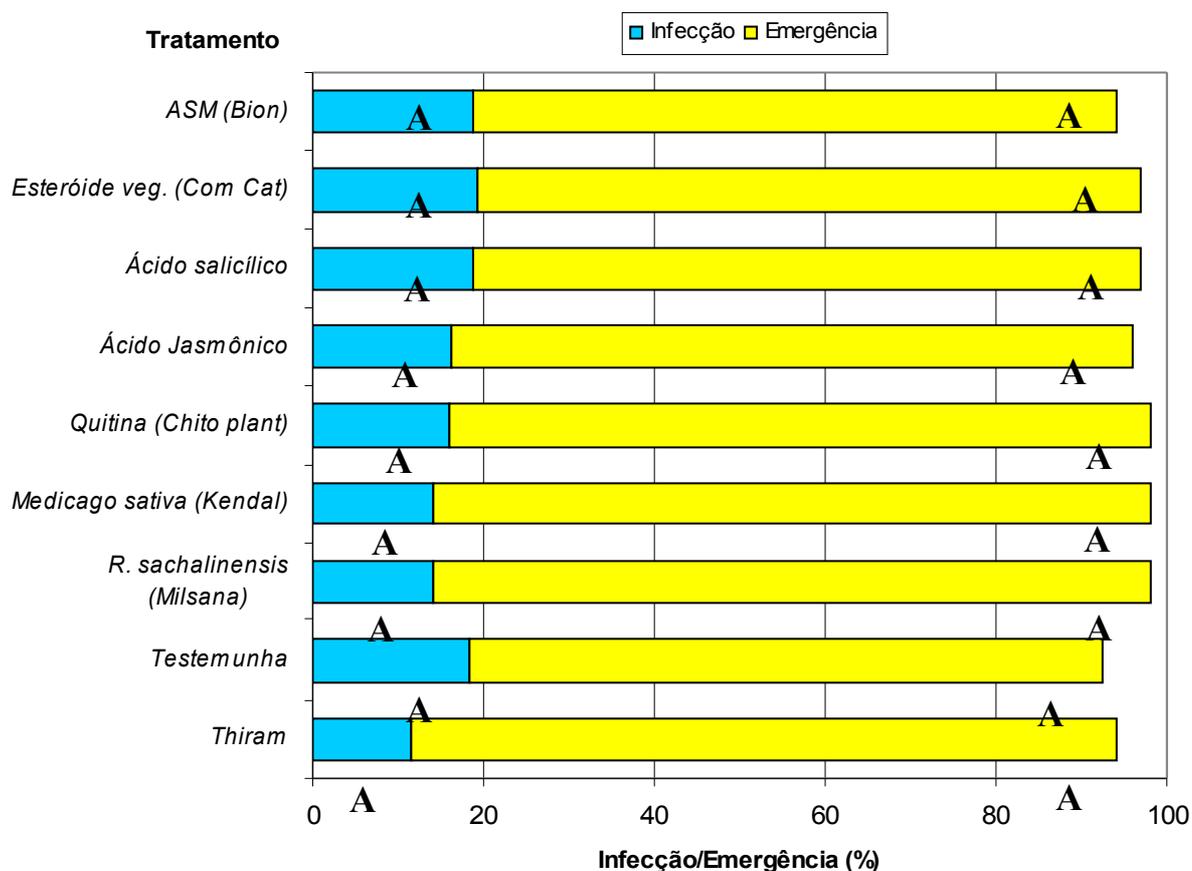


Figura 7. Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com indutores de resistência, duas semanas após a semeadura. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey 5%).

Na emergência não houve diferença significativa entre os tratamentos, cuja resposta foi igual para a porcentagem de plantas doentes. Porém em nenhum dos tratamentos houve a máxima emergência ou controle total da doença. Os resultados discordam dos encontrados por Jahn *et al.*, (2005b) que obtiveram para o patossistema feijão-*Colletotrichum lindemuthianum*, 100% de plantas sadias utilizando os indutores de resistência, ácido salicílico, quitina, acibenzolar S-methyl e extrato de *Reynoutria sachalinensis*.

Porém, Soares e Maringoni (2002) observaram que para o patossistema feijão e *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfacien*, o tratamento de sementes com acibenzolar S-methyl em concentrações de 25 a 75g de i.a./100 kg de sementes, no que

se refere a emergência de plantas, não foi positiva, resultando na emergência de plantas consideradas anormais no seu desenvolvimento ou estavam infeccionadas com fungos de armazenamento ou apodreceram pela ação de microrganismos. No entanto, em sementes de ervilha, o acibenzolar-S-methyl não resultou em plantas anormais, como sua emergência não foi reduzida.

A atividade inibitória de acibenzolar-S-methyl *in vitro* em meio de cultura com BDA ou agar Czarpek não foi observada quanto ao crescimento micelial dos patógenos *Colletotrichum lagenarium* e *Cladosporium cucumerinum*, causadores de antracnose e sarna na cultura do pepino. Porém, em casa-de-vegetação, quando acibenzolar-S-methyl foi pulverizada nas folhas, foi observada a eficácia do produto; no entanto, observou-se também fitotoxicidade de acibenzolar-S-methyl (100 µg ml⁻¹) assim como clorose, amarelecimento ou formação de mosaico nas folhas tratadas. O nível da fitotoxicidade conforme os autores pareceram ser variáveis de acordo com as condições ambientais, como luz e/ou condições de temperatura (Ishii *et al.*, 1999).

Na Figura 8 estão apresentados os resultados obtidos com tratamentos físicos nas sementes de ervilha no qual houve uma diferença significativa entre os tratamentos com vapor aerado a 74 °C e tratamento químico com procloraz na emergência de plantas. Tratamentos com elétrons de baixa energia entre 130 ou 140 kV, água aquecida e vapor aerado a 70 °C não diferiram da testemunha e do tratamento químico thiram na emergência.

Na porcentagem de plantas doentes, os tratamentos com elétrons de baixa energia, água aquecida e a testemunha foram semelhantes ao tratamento químico com thiram. Porém se comparando com procloraz, os tratamentos foram ineficientes no controle do patógeno. Ao utilizar a temperatura mais alta a 74°C houve um aumento no índice de infecção de plantas, quando comparado ao tratamento com a temperatura mais baixa a 70 °C. Quando utilizado a temperatura a 74 °C, provavelmente não foi letal ao patógeno, porém foi letal aos outros microrganismos que se encontravam juntamente a semente, o que favoreceu para o aumento de *A. pisi*, como também, pôde ser observado que a alta temperatura reduziu a emergência, mesmo este não diferindo estatisticamente de outros tratamentos.

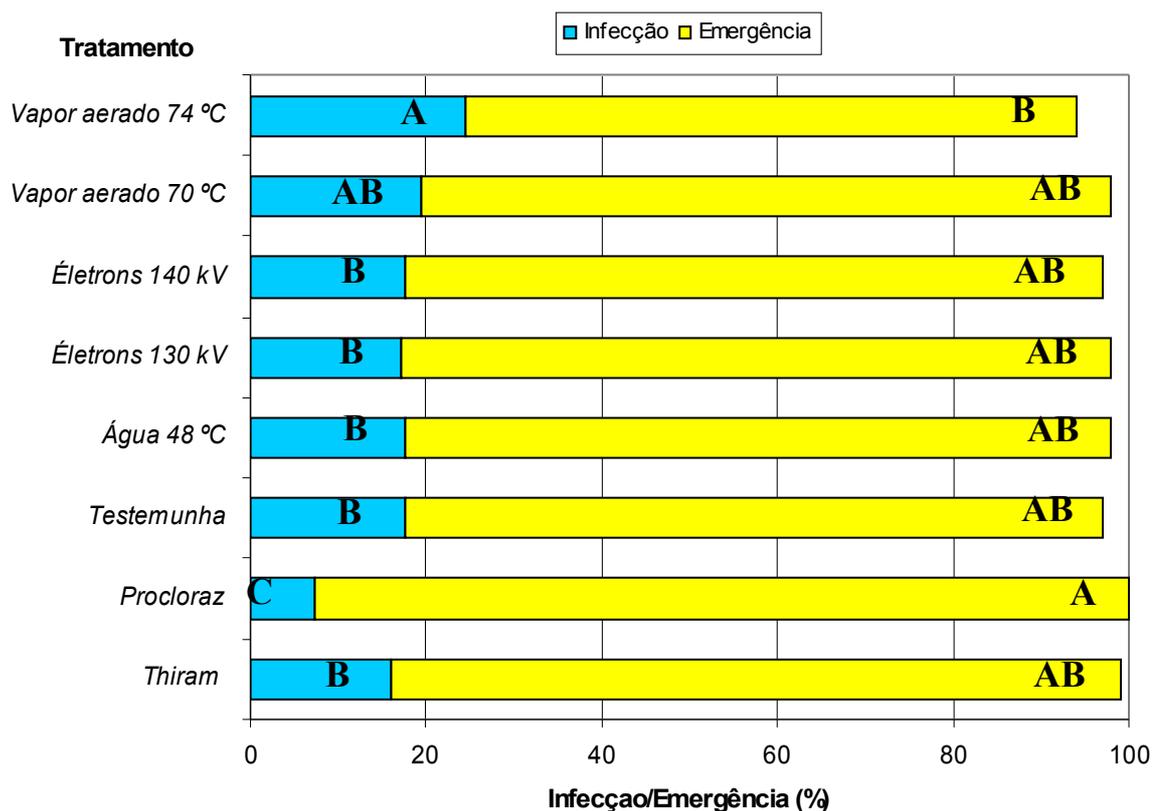


Figura 8. Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com métodos físicos, duas semanas após a sementeira. Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey 5%).

Segundo Jahn e Puls (1998), o tratamento com elétrons na dose de 10 kGy em sementes de cenoura infectadas por *Alternaria* spp., *in vitro*, reduziu em até 50% a infecção fúngica. Porém no presente trabalho os tratamentos não responderam eficientemente, não diferindo do tratamento testemunha; o que está de acordo com Tilcher e Vogt-Kaute (2004), que avaliaram o tratamento com elétrons em sementes de ervilha infectadas com *A. pisi* e concluíram que o tratamento é ineficaz.

A otimização dos parâmetros do tratamento requer conhecimento da anatomia da semente e da dose necessária para matar o fitopatógeno. Há uma relação direta entre a espessura da cobertura da semente e o nível de voltagem ótima (Jahn e Puls, 1998).

Para os tratamentos físicos, não há uma regra para tempo e temperatura, pois, a sua eficiência depende, em grande parte, do tipo e localização do patógeno alvo, do vigor da semente e da sensibilidade da semente a temperaturas elevadas (Menten, 1995).

Na Figura 9 observa-se o resultado obtido no tratamento de sementes de ervilha com os métodos físicos associados com os microrganismos antagonistas. Não houve diferença significativa entre os tratamentos na emergência de plantas.

Para a porcentagem de plantas doentes, os tratamentos com elétrons de baixa energia a 130 kV e 140 kV + tratamentos *B. subtilis* (Serenade) foram os que resultaram em eficiências equivalentes aos tratamentos químicos.

A associação dos tratamentos Serenade + água a 48 °C, e os tratamentos com o produto Micosat e *C. rosea* resultaram-se semelhantes à testemunha sem tratamento, onde o índice de infecção variou de 10,1 a 21,5%.

Tratamentos com elétrons de baixa energia representam um método de tratamento de sementes completamente novo. Assim, existem poucos estudos referentes ao assunto. A necessidade de restringir o efeito dos elétrons nas camadas mais profundas da semente é o principal fator para determinar o uso deste método (Jahn e Puls, 1998).

Novos estudos são necessários, para que possam ser recomendadas outras opções para tratamento de sementes de ervilha, que estejam de acordo com as normas para produção dos orgânicos, ou seja, eliminar completamente o uso de defensivos químicos, através do uso de produtos eficientes no controle de patógenos inclusive aqueles presentes na semente. Tais produtos devem proporcionar uma relação custo benefício equivalente aos produtos químicos.

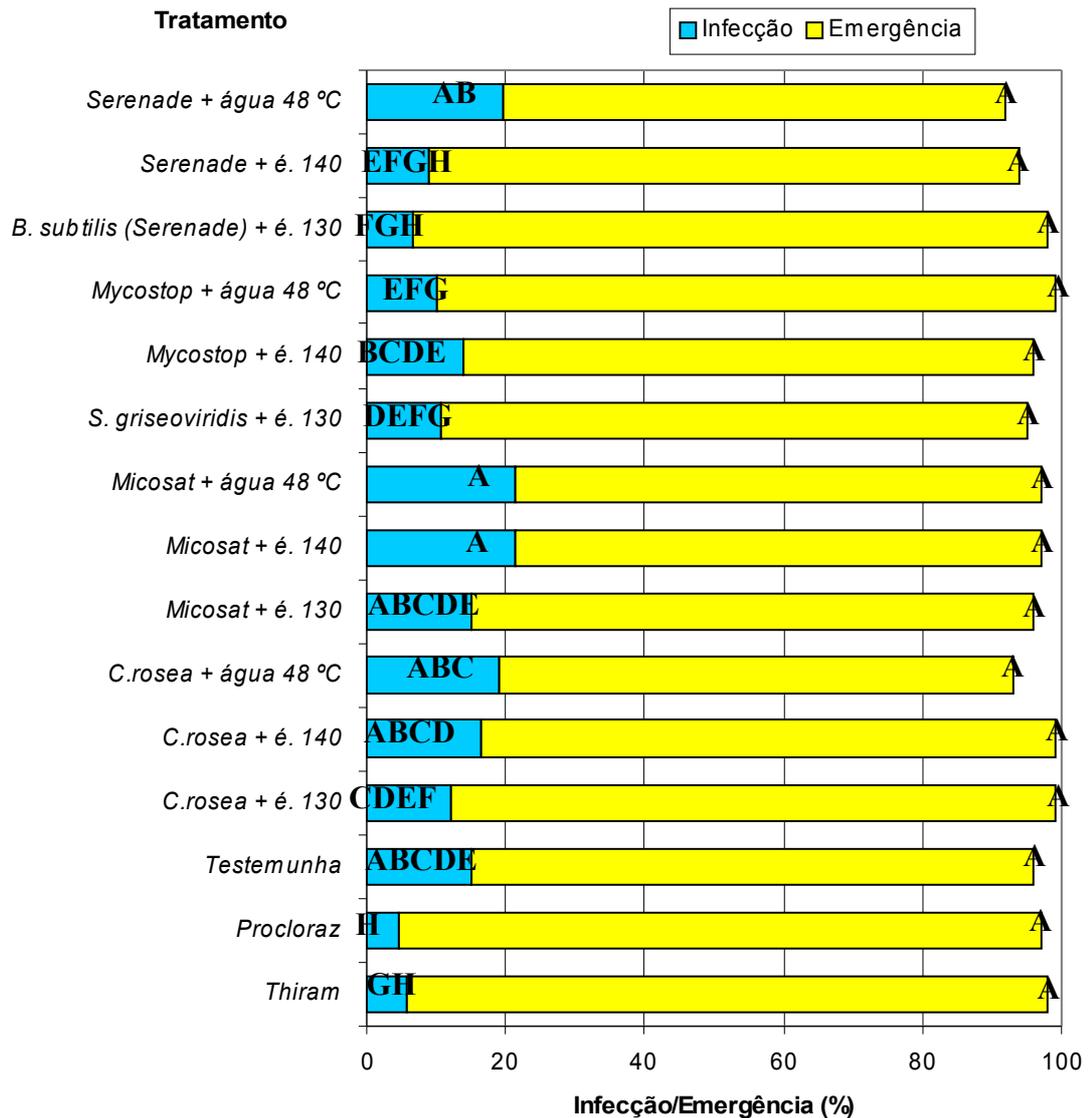


Figura 9. Emergência e índice de infecção em plantas de ervilha com sementes tratadas com a associação de métodos físicos e controle biológico, duas semanas após a semeadura.

Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si (Tukey 5%).

5 CONCLUSÃO

Os tratamentos eficientes no controle de *Ascochyta pisi* foram:

Tratamentos com microrganismos cultivados em laboratório *Clonostachys rosea* IK 726, produto comercial Micosat (*Glomus* sp. + *Pseudomonas fluorescens* + *P. borealis* + *Bacillus subtilis*), extrato vegetal óleo de *Thymus vulgaris* e elétrons de baixa energia a 130 kV e 140kV + controle biológico de *Bacillus subtilis* (Serenade) foram tão eficazes quanto o tratamento químico.

Pseudomonas sp. (SLU4), bactéria da rizosfera do milho (RG 6), *Fusarium oxysporum* (MSA 35) e o tratamento físico vapor aerado a 74 °C reduziram a emergência de plantas, não sendo, portanto recomendados.

O controle de *A. pisi* em sementes de ervilha com produtos/métodos alternativos ao controle químico é viável, pois, se a semente infectada é o principal agente disseminador de *A. pisi* para áreas onde a doença não ocorre, o tratamento de sementes pode reduzir o inóculo e assim reduzir os danos que pode vir a acarretar. E ainda, para que ocorra o sucesso, o conhecimento de cada patossistema é fundamental para se determinar produtos, doses e métodos alternativos de controle de patógenos em sementes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROFIT, 2005. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Serviços – agrotóxicos-sistema Agrofit. Disponível em: <www.agricultura.gov.br> Acessado em 01 de dezembro de 2005.

COOK, R. J. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. **Annual Review Phytopathology**, v. 31. p. 53-80, 1993.

COOK, R. J.; BAKER, K. F. Components of biological control. In: Cook, R. J.; Baker, K. F. (ed.). **The nature and practice of biological control of plant pathogens**. American Phytopathological Society, St. Paul, MN, USA. 1983. p. 57-83.

COUNCIL REGULATION (EEC) N° 2092/91 of 24 June 1991. CONSLEG: 1991R2092 – 01/05/2004. Office for Official Publications of the European Communities.

COUTO, F. A. A. Aspectos históricos e econômicos da cultura da ervilha. **Informe Agropecuário**, v. 14, n. 158, p. 5-7, 1989.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, p. 39-44, 2003.

DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. Principais técnicas de tratamento de sementes. In: DHINGRA, O. D.; MUCHOVEJ, J. J.; CRUZ FILHO, J. **Tratamento de sementes (controle de patógenos)**. Viçosa, UFV, 1980. p. 16-35.

e-ventus, 2005: Fraunhofer, Institut Elektronenstrahl und Plasmatechnik – e⁻ dressing of seed environmentally friendly and reasonable. Disponível em: <http://www.fraunhofer.de/enu/images/e-ventus_eng_tcm_15-676.pdf> Acessado em 06 de outubro de 2005.

EMBRAPA-CNPAB, 2003: Embrapa Agrobiologia. 2003 – um ano inesquecível para a agricultura orgânica no Brasil. Disponível em:
<http://www.cnpab.embrapa.br/servicos/artigos/ano_inesquecivel.html> Acessado em 06 de outubro de 2005.

FAO, 1999: La agricultura orgánica – La demanda de productos orgánicos ha creado nuevas oportunidades de exportación para el mundo en desarrollo. Disponível em:
<<http://www.fao.org/ag/esp/revista/9901sp3.htm>> Acessado em 06 de outubro de 2005.

FILGUEIRA, F. A. R. Fabáceas feijão – vagem e outras favas. In: FILGUEIRA, F. A. R. (ed.). **Novo Manual de Olericultura – Agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. Viçosa, UFV, 2003. p. 316-327.

FORSBERG, G. Heat sanitation of cereal seeds with a new, efficient, cheap and environmentally friendly method. In: SEED TREATMENT CHALLENGERS AND OPPORTUNITIES, BCPC Symposium, 76. **Proceedings...** Biddle, British Crop Protection Council: Farnham. 2001. p. 111-116.

FORSBERG, G. *Control of cereal seed-borne diseases by hot humid air seed treatment*. Uppsala, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae Agraria, 2004. 49p. (Tese Doutorado).

HARMAN, G. E. Seed treatments for biological control of plant disease. **Crop Protection**, v. 10, n. 10, p. 166-171, 1991.

HÖKEBERG, M.; GERHARDSON, B.; JOHNSON, L. Biological control of cereal seed-borne diseases by seed bacterization with greenhouse-selected bacteria. **European Journal of Plant Pathology**, v. 103, n. 1, p. 25-33, 1997.

IBGE, 2003: Economia – Agropecuária – Produção Agrícola Municipal (PAM). Disponível em:
<<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pam/2003/pam2003.pdf>> Acesso em 02 de novembro de 2005.

ISHII, H.; TOMITA, Y.; HORIO, T.; NARUSAKA, Y.; NAKAZAWA, Y.; NISHIMURA, K.; IWAMOTO, S. Induced resistance of acibenzolar-S-methyl (CGA 245704) to cucumber and Japanese pear diseases. **European Journal of Plant Pathology**, v. 105, n. 1, p. 77-85, 1999.

JACKSON, A. O.; TAYLOR, C. B. Plant-microbe interactions: Life and death at the interface. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1651-1668, 1996.

JACOBSEN, B. J.; BACKMAN, P. A. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. **Plant Disease**, v. 77, n. 3, p. 311-315, 1993.

JAHN, M.; PULS, A. Investigations for development of a combined biological-physical method to control soil-borne and seed-borne pathogens in carrot seed. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 105, n. 4, p. 359-375, 1998.

JAHN, M.; KROMPHARDT, C.; FORSBERG, G.; WERNER, S.; WIKSTRÖM, M.; TINIVELLA, F.; ROBERTS, S. J. **Evaluation of hot water, hot air and electron treatment for seed sanitation in organic vegetable production**. In: ISTA – SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM, 5. Angers, France, 10-13 May 2005a. p. 21-22.

JAHN, M.; KOCH, E.; SCHMITT, A. EU- project “**Seed treatments for organic vegetable production**”. In: ISTA – SHC SEED HEALTH SYMPOSIUM, 5. Angers, France, 10-13 May 2005b. p. 24.

JOHANSSON, L.; HÖKEBERG, M.; GERHARDSON, B. Performance of the *Pseudomonas chlororaphis* biocontrol agent MA 342 against cereal seed-borne diseases in field experiments. **European Journal of Plant Pathology**, v. 104, n.7, p. 701-711, 1998.

KILIAN, M.; STEINER, U.; KREBS, B.; JUNGE, H.; SCHMIEDEKNECHT, G.; HAIN, R. FZB 24[®] *Bacillus subtilis* – mode of action of a microbial agent enhancing plant vitality. **Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer**, v. 53, n. 1, p. 72-93, 2000.

LÜBECK, M.; KNUDSEN, I. M. B.; JENSEN, B.; THRANE, U.; JANVIER, C.; FUNCK JENSEN, D. GUS and GFP transformation of the biocontrol strain *Clonostachys rosea* IK726 and the use of these marker genes in ecological studies. **Mycological Research**, v. 106, n. 7, p. 815-826, 2002.

MACHADO, J. C. O controle de patógenos associados a sementes. In: MACHADO, J. C. **Patologia de sementes – fundamentos e aplicações**. Brasília: Ministério da Educação, ESAL/FAEPE, 1988. p. 51-72.

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

MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. Antifungal hydrolases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1-3-glucanase. **Plant Physiology**, v. 88, n. 3, p. 936-942, 1988.

MAUCH-MANI, B.; MÉTRAUX, J. P. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. **Annals of Botany**. v. 82, n. 5, p. 535-540, 1998.

MELO, I. S. Agentes microbianos de controle de fungos fitopatogênicos. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (ed.). **Controle biológico**. EMBRAPA-CNPMA, 1998. p. 17-67.

MENTEN, J. O. M. Importância do tratamento de sementes. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 2. São Paulo, 1995. **Anais...** São Paulo, CIBAAGRO, 1995. p. 203-224.

MENTEN, J. O. M. Tratamento de sementes. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PATOLOGIA DE SEMENTES, 4. Campinas, 1996. **Anais...** Campinas: Fundação Cargill, 1996. p. 3-23.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. Normas Para a Produção de Produtos Orgânicos Vegetais e Animais. Instrução Normativa N° 7, DE 17 de Maio de 1999.

MINUTO, A.; MINUTO, G.; MIGHELL, Q.; MOCIONI, M.; GULLINO, M. L. Effect of antagonistic *Fusarium* spp. and of different commercial biofungicide formulations on Fusarium wilt of basil (*Ocimum basilicum* L.). **Crop Protection**, v. 16, n. 8, p. 765-769, 1997.

NEGA, E.; ULRICH, R.; WERNER, S.; JAHN, M. Hot water treatment of vegetable seed – an alternative seed treatment method to control seed-borne pathogens in organic farming. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 110, n. 3, p. 220-234, 2003.

NEVES, M. C. P.; MEDEIROS, C. A. B.; ALMEIDA, D. L.; DE-POLLI, H.; RODRIGUES, H. R.; GUERRA, J. G. M.; NUNES, M. U. C.; CARDOSO, M. O.; AZEVEDO, M. S. F. R.; VIEIRA, R. C. M. T.; SAMINÊZ, T. C. O. **Agricultura Orgânica: Instrumento para a Sustentabilidade dos Sistemas de Produção e Valoração de Produtos Agropecuários**. EMBRAPA - Agrobiologia. Documentos, 122, Seropédica, 2000, 22p.

NIRANJAN RAJ, S.; DEEPAK, S. A.; BASAVARAJU, P.; SHETTY, H. S.; REDDY, M. S. Comparative performance of formulations of plant growth promoting rhizobacteria in growth promotion and suppression of downy mildew in pearl millet. **Crop Protection**, v. 22, n. 4, p. 579-588, 2003.

OSBURN, R. M.; MILNER, J. L.; OPLINGER, E. S.; SMITH, R. S.; HANDELSMAN, J. Effect of *Bacillus cereus* UW 85 on the yield of soybean at two field sites in Wisconsin. **Plant Disease**, v. 79, n. 6, p. 551-556, 1995.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (ed.). **Manual de Fitopatologia - Princípios e conceitos**. Piracicaba, Ceres, 1995. p. 417-452.

PAULITZ, T. C.; BÉLANGER, R. R. Biological control in greenhouse systems. **Annual Review Phytopathology**, v. 39, p. 103-133, 2001.

PIEROBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. **Manual de sanidade de sementes**. Disponível em: <<http://www.patologiadesementes.com.br>> Acesso em 10 de agosto de 2005.

POLITICHEAGRICOLE, 2001 - Ministero delle Politiche Agricole e Forestali.

Disponível em:

<<http://www.politicheagricole.it/INFO/INIZIATIVE/VerduraCulturale/piselli.htm>>

Acesso em 02 de novembro de 2005.

POLITICHEAGRICOLE, 2004 - Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Aree produttive/Agricoltura biologica/ L'agricoltura biologica in Italia. Disponível em: <<http://www.politicheagricole.it/>> Acesso em 02 de novembro de 2005.

ROBERTI, R.; LUGARESI, C. **La protezione delle sementi e delle coltura orticole da seme. Sintese dell'intervento.** In: CONVEGNO SEMENTIERO,53. Cesena, Italia, 2002.

RYALS, J. A.; NEUENSCHWANDER, K. H.; WILLITS, M. G.; MOLINA, A.; STEINER, H-Y; HUNT, M. D. Systemic acquired resistance. **The Plant Cell**, v. 8, n. 10, p. 1809-1819, 1996.

SCHERM, H.; NGUGI, H. K.; SAVELLE, A. T.; EDWARDS, J. R. Biological control of infection of blueberry flowers caused by *Monilinia vaccinii-corymbosi*. **Biological Control**, v. 29, n. 2, p. 199-206, 2004.

SHARMA, R. D.; FONSECA, C. E. L. Efeito de *Meloidogyne javanica* no crescimento da ervilha. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 115-120, 2000.

SOARES, R. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de acibenzolar-S-methyl sobre a germinação e desempenho de sementes de feijoeiro e na indução de resistência à murcha de *Curtobacterium*. **Summa Phytopathologica**, v. 28, n. 1, p. 41-45, 2002.

STANGARLIN, J. R.; FRANZENER, G.; PASCHOLATI, S. F. Doenças da ervilha (*Pisum sativum* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (ed.). **Manual de Fitopatologia – Doenças de plantas cultivadas**. Piracicaba, Ceres, 2005. p. 311-317.

STOVE, 2002 – Seed Treatments for Organic Vegetable Production – Objectives. Disponível em: <<http://www.stove-project.net/index2.html>> Acesso em 06 de outubro de 2005.

TILCHER, R.; VOGT-KAUTE, W. **The effect of seed treatment for the control of bird damage in corn and Ascochyta blight of pea.** In: WORLD CONFERENCE ON ORGANIC SEED, 1. Roma, Itália, 2004. p. 138-141.

TINIVELLA, F.; GULLINO, M. L.; AMEIN, T.; WRIGHT, S. A. I.; VAN der WOLF, J.; SCHIMITT, A.; KOCH, E. **Evaluation of microorganisms, plant extracts and other agents of natural origin as seed treatments for vegetables in organic farming.** Poster presented at the “GERMAN PLANT PROTECTION CONFERENCE”, Hamburg, 2004.

TOMM, G. O.; LIMA, G. J. M. M. **Desenvolvimento da cultura de ervilha para alimentação animal no Sul do Brasil.** EMBRAPA-EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, CNPT. Comunicado Técnico *on line*, 54, Passo Fundo, 2000.

TON, J.; VAN PELT, J. A.; VAN LOON, L. C.; PIETERSE, C. M. J. Differential effectiveness of salicylate-dependent and jasmonate/ethylene-dependent induced resistance in Arabidopsis. **Molecular Plant-microbe Interactions**, v. 15, n. 1, p. 27-34, 2002.

TOWNSEND, G. R.; HEUBERGER, J. W. Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. **The Plant Disease Reporter**, v. 27, n. 17, p. 340-343, 1943.

TRAPERO-CASAS, A.; KAISER, W. J.; INGRAM, D. M. Control of Pythium seed rot and preemergence damping-off of chickpea in the U.S. Pacific Northwest and Spain. **Plant Disease**, v. 74, n. 8, p. 563-569, 1990.

WANG, H.; HWANG, S. F.; CHANG, K. F.; TURNBULL, G. D.; HOWARD, R. J. Characterization of *Ascochyta* isolates and susceptibility of pea cultivars to the ascochyta disease complex in Alberta. **Plant Pathology**, v. 49, p. 540-545, 2000.

WANG, H.; HWANG, S. F.; CHANG, K. F.; TURNBULL, G. D.; HOWARD, R. J. Suppression of important pea disease by bacterial antagonists. **BioControl**, v. 48, n. 4, p. 447-460, 2003.

APÊNDICE

A1. Meios de cultura utilizados

Meio BDA+S

1 L. de água destilada

39 g. de BDA. Misturar e autoclavar por 15 minutos a 120 °C, e adicionar 25 mg de Sulfato de estreptomicina.

Meio NYDA

20 g. de agar

8 g. de caldo nutritivo

4 g. de extrato de levedura

1,5 g. de dextrose

1 L. de água destilada. Misturar e autoclavar por 15 minutos a 120 °C.

Meio NYDB

8 g. de caldo nutritivo

4 g. de extrato de levedura

1,5 g. de dextrose

1 L. de água destilada. Misturar e autoclavar por 15 minutos a 120 °C.

Caseína hidrolisada

1 g. de extrato de levedura;

2 g. de hidrolisado de caseína;

1,5 g. de fosfato de potássio monobásico;

1 g. de sulfato de magnésio;

15 g. de glucose;

10 mL de solução A-Z

1 L. de água destilada. Misturar e autoclavar por 15 minutos a 120 °C.



A2. Sementes de ervilha uma semana após plaqueadas, e incubadas em ambiente controlado.



A3. Estádio de avaliação da planta, duas semanas após a sementeira.

A4. Contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônias)

Câmara Bürker

Para se calcular a concentração do inóculo.

Diluir 10 ou 100 vezes a suspensão do inóculo obtido no meio de caseína hidrolisada. A partir da diluição, colocar uma gota sobre a câmara de Bürker e cobrir com a lamínula. Contar o número de conídios em vários quadrados (16 ou 32) da câmara. Calcular a média geral de contagem de conídios.

Calcular a Concentração do Inóculo conforme fórmula abaixo:

Conc. do Inóculo = média da contagem x 250.000 x diluição inicial (10 ou 100).

Média da Contagem = número total de conídios de 16 ou 32 quadrados

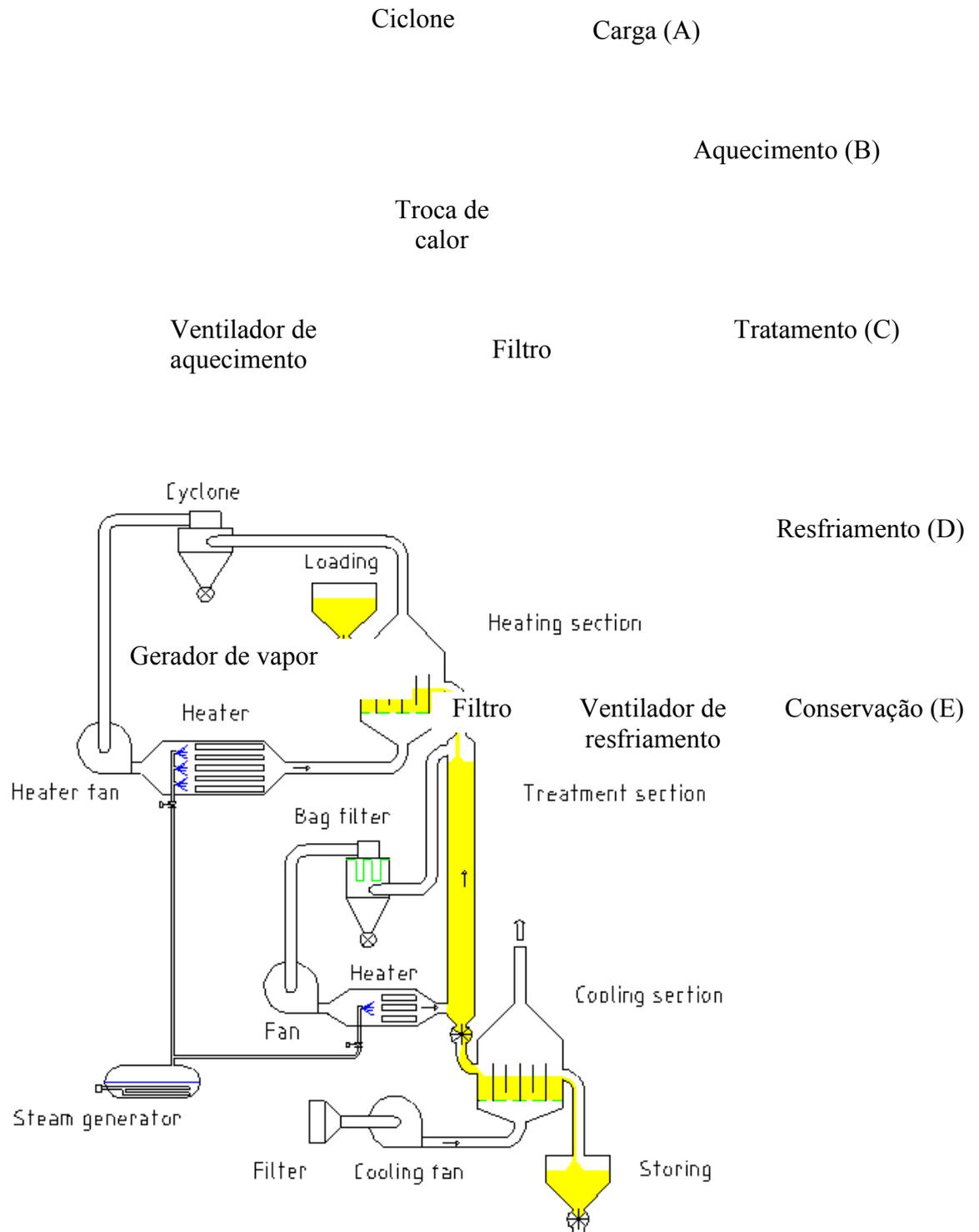
Número de quadrados contados



A5. Equipamento desenvolvido pela *e-ventus*, para tratamento de sementes com elétrons de baixa energia.



A6. Equipamento para tratamento de sementes com vapor aerado (Forsberg *et al.*, 2001).



A7. Representação esquemática e descritiva da máquina para o tratamento térmico com vapor aerado e descrição de diversas fases do tratamento (Forsberg *et al.*, 2001).

Carga (A): a velocidade de carga de sementes é controlada.

Aquecimento (B): há o controle da temperatura e umidade, as sementes descem rapidamente e ocorre o aquecimento do ar.

Tratamento (C): temperatura e umidade do ar que circula se mantêm constante durante o período de tratamento.

Resfriamento (D): as sementes são resfriadas rapidamente, para que a máquina interrompa o tratamento exatamente ao fim do tempo previsto. O calor liberado pelas sementes na fase de resfriamento é reutilizado na fase B.

Conservação (E): as sementes apresentam umidade relativa adequada para serem conservadas, após o tratamento.

A8. Avaliação da amostra do lote de sementes de ervilha infectadas por *Ascochyta pisi*, duas semanas após a semeadura em casa-de-vegetação. Total de plantas emergidas e avaliadas em cada classe e a porcentagem de plantas infectadas.

Classe de sintomas	Total de Plantas/Classe	% de Infecção por Townsend-Heuberger
0	35	0,00
1	33	6,81
2	20	8,26
3	4	2,48
4	2	1,65
5	3	3,10
Total	97	22,30

