

**POTENCIALIDADE DO TRATAMENTO DE  
SEMENTES COM ÓLEOS ESSENCIAIS NO  
PATOSSISTEMA *Stenocarpella maydis* MILHO**

**GLAUCO ANTÔNIO TEIXEIRA**

**2010**

**GLAUCO ANTÔNIO TEIXEIRA**

**POTENCIALIDADE DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM ÓLEOS  
ESSENCIAIS NO PATOSSISTEMA *Stenocarpella maydis* MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador

Prof. Dr. Eduardo Alves

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA**

Teixeira, Glauco Antônio.

Potencialidade do tratamento de sementes com óleos essenciais  
no patossistema *Stenocarpella maydis* milho / Glauco Antônio  
Teixeira. – Lavras : UFLA, 2010.

39 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. Doença fúngica. 3. *Zea mays*. 4.  
Podridão-do-colmo. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.44

**GLAUCO ANTÔNIO TEIXEIRA**

**POTENCIALIDADE DO TRATAMENTO DE SEMENTES COM  
ÓLEOS ESSENCIAIS NO PATOSSISTEMA *Stenocarpella maydis* MILHO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 15 de janeiro de 2010

Prof. Hilário Antônio de Castro UFLA

Prof. João Almir Oliveira UFLA

Prof. José da Cruz Machado UFLA

Prof. Eduardo Alves  
UFLA  
(Orientador)

LAVRAS  
MINAS GERAIS – BRASIL

A Deus, por iluminar  
meus passos.

**Dedico**

A meus queridos pais, Antônio e Marta, por serem a razão da minha motivação e perseverança. A meus irmãos, Ramon e Pablo, pelo apoio e amizade.

**Ofereço**

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal de Lavras, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela oportunidade e pela bolsa de estudos.

Ao professor Eduardo Alves, pela oportunidade e pela orientação.

Ao professor José da Cruz Machado, pelos ensinamentos e contribuições.

Aos professores: Hilário, Ludwig, Mário Lúcio, Mário Sobral, Antônia, Ricardo Magela, Edson Pozza, João Almir, Paulo Estêvão e Vicente.

Aos funcionários e amigos: Eloísa, Ruth, Ana Maria, Eliane, Bruno, Vladimir (Toquinho), Carzinho, Ângela, Elenice, Ruthinha, Jaciara, Rosângela e Eliete.

Aos colegas de laboratório, Douglas, Cláudia, Fabiano, Luciane, Gilvaine e Julian.

Aos amigos Eudes, Roberto, Luiz Henrique, Henrique, João Gir, Rodrigo (Piu), Stélio, Felipe, Natália, Vivian, Carol, Carlinha, Luciana Lima, Vanessa, Aninha, Érika, Eduardo, Cleílson, Pedro, Ricardo (Foguinho), Eloísa (Biotita), Cristiano (Pp), Ellen, Lilian, Ogoshi, Helon, Gustavo (Maisena), Samuel e Edgar.

Aos amigos da República, André, Carlos (Codorna), Ésdras, Fábio e Walmes.

E a todos que contribuíram, direta e indiretamente, para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REFERENCIAL TEÓRICO .....	3
2.1 Aspectos morfológicos e taxonômicos de <i>Stenocarpella maydis</i> .....	3
2.2 Histórico e relações patogênicas de <i>Stenocarpella maydis</i> em milho.....	3
2.3 Aspectos epidemiológicos .....	6
2.4 Medidas de controle de <i>Stenocarpella</i> .....	6
2.5 Aplicação da microscopia eletrônica no estudo da interação planta – patógeno.....	8
3 MATERIAL E MÉTODOS .....	11
3.1 Obtenção e cultivo do isolado.....	11
3.2 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais na germinação de conídios e no crescimento micelial de <i>Stenocarpella maydis</i> .....	11
3.3 Inoculação das sementes.....	13
3.4 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais na incidência de <i>Stenocarpella</i> <i>maydis</i> em sementes de milho inoculadas artificialmente e sobre a germinação e o vigor das sementes .....	14
3.5 Estudo dos eventos de pré-penetração e penetração de <i>Stenocarpella maydis</i> em tecidos foliares de milho tratados com óleos essenciais .....	16
3.5.1 Coleta das amostras para microscopia eletrônica de varredura.....	16
3.5.2 Preparo e observação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	18
4.1 Efeito de óleos essenciais na germinação de conídios e no crescimento micelial de <i>Stenocarpella maydis</i> .....	18

4.2 Efeito de óleos essenciais sobre a incidência de <i>Stenocarpella maydis</i> em sementes de milho inoculadas artificialmente e sobre a germinação e o vigor das sementes.....	22
4.3 Eventos de pré-penetração e penetração de <i>Stenocarpella maydis</i> em tecidos foliares de milho tratados com óleos essenciais .....	25
5 CONCLUSÕES .....	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	31

## RESUMO

TEIXEIRA, Glauco Antônio. **Potencialidade do tratamento de sementes com óleos essenciais no patossistema *Stenocarpella maydis* milho**. 2010. 39 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

O Brasil destaca-se como um dos maiores produtores de milho do mundo, com expectativas de crescimento na produção. Concomitantemente, é percebido o aumento de doenças que prejudicam a cultura, destacando-se a podridão do colmo (*Stenocarpella maydis*), a qual está sendo controlada por meio do uso de cultivares resistentes, manejo cultural e pelo tratamento das sementes com fungicidas, cuja diversidade de produtos proporciona alternativas ao produtor, entretanto, provoca aumento no custo de produção e danos ao ambiente. Alternativas para o controle dessa doença são necessárias. Portanto, este trabalho foi realizado com os objetivos de avaliar os efeitos dos óleos essenciais de citronela, tomilho, capim-limão, eucalipto, canela e cravo na germinação de conídios e no crescimento micelial de *S. maydis* e seus efeitos sobre a incidência de *S. maydis* em sementes de milho inoculadas artificialmente e sobre a germinação e vigor, e determinar, por meio da microscopia eletrônica de varredura, o possível modo de ação desses óleos sobre o fungo *Stenocarpella maydis*. Os óleos essenciais de cravo-da-índia, canela e tomilho inibiram a germinação de conídios em todas as concentrações testadas. A menor faixa de inibição do crescimento micelial se deu nas concentrações entre 0,025 e 0,05%. Os óleos de cravo-da-índia e canela asseguraram a germinação das sementes em 89,0% e 84,5%, respectivamente, ao passo que a testemunha não inoculada germinou 93,0% e a testemunha inoculada, 76,5%. Os óleos de cravo-da-índia e canela reduziram a incidência do patógeno nas sementes para 39,0% e 28,0%, respectivamente, ao passo que, na testemunha inoculada, a incidência foi de 57,0%. Estes mesmos óleos mais o óleo essencial de tomilho proporcionaram menor queda de estande, quando comparados à testemunha não inoculada. Os óleos essenciais de cravo-da-índia e tomilho atuaram diretamente sobre o conídio do fungo. Para os demais óleos, são necessários estudos mais aprofundados utilizando dosagens mais elevadas, tornando possível, assim, encontrar resultados mais promissores.

---

Comitê Orientador: Eduardo Alves – UFLA (Orientador) e José da Cruz Machado – UFLA.

## ABSTRACT

TEIXEIRA, Glauco Antônio. **Potential of seed treatment with essential oils in corn pathosystem *Stenocarpella maydis***. 2010. 39 p. Dissertation (Master in Agronomy/Phytopathology) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

Brazil is one of the largest corn producers in the world, with expectations for yield growth. Concomitantly, the increases of diseases that affect the culture have been noticed. Stalk rot (*Stenocarpella maydis*) standing out, which is being controlled through the use of resistant cultivars, cultural managements and by the treatment of the seeds with fungicides, whose diversity of products provides alternatives to the producer. However, it provokes an increase in the production cost and damage to the environment. Alternatives for the control of this disease are necessary. Therefore, the goals of this work were to evaluate the effects of the essential oils of citronella, thyme, lemon-grass, eucalyptus, cinnamon and India clove on the conidia germination and the mycelial growth of *S. maydis*; and their effects on the incidence of *S. maydis* in corn seeds inoculated artificially and on their germination and vigor; to determine, through scanning electron microscopy, the possible action mechanism of these oils on the *S. maydis* fungus. The essential oils of India clove, cinnamon and thyme inhibited the conidia germination at all of the tested concentrations. The lowest mycelial growth inhibition range was at the concentrations between 0.025 and 0.05%. The India clove and cinnamon oils assured the germination of the seeds in 89.0 and 84.5%, respectively, while the non-inoculated control germinated 93.0% and the inoculated control 76.5%. The India clove and cinnamon oils reduced the incidence of the pathogen in seeds to 39.0 and 28.0%, respectively, while in the inoculated control it was of 57.0%. These same oils plus the essential oil of thyme provided lower stand fall when compared to inoculated control. The essential oils of India clove and thyme were shown to act directly on the conidia of the fungus. For the other oils, more in-depth studies are necessary using higher dosages thus making it possible to find more promising results.

---

Advising Committee: Eduardo Alves – UFLA (Adviser) and José da Cruz Machado – UFLA.

## 1 INTRODUÇÃO

Dentre as principais espécies vegetais utilizadas na alimentação humana e animal, o milho é um dos mais destacados. No mundo, são cultivados cerca de 140 milhões de hectares, distribuídos em 158 países, que contribuem anualmente com uma produção de, aproximadamente, 600 milhões de toneladas. O Brasil destaca-se como o terceiro maior produtor, responsável por 9,90% da produção mundial e apresenta produtividade média de 3.050 kg/ha, menos da metade da produtividade média dos EUA, que é de 8.160 kg/ha (United States Department of Agriculture - USDA, 2006).

A estimativa para a primeira safra de milho 2009/10 é de redução da área plantada de 13.342,7 para 12.433,0 mil hectares, 9,3% a menos que na safra 2008/09. A produtividade média tende a aumentar cerca de 4,8%, chegando a 3.769,5 kg/ha. Com isso, mesmo com a diminuição da área, estima-se que haverá queda de apenas 0,02% na produção, chegando a 50.152,9 mil toneladas do grão (Companhia Nacional de Abastecimento - CONAB, 2009).

A cultura do milho está presente em todas as regiões do país. Minas Gerais é um dos maiores produtores, com destaque para as regiões Sul (249 mil hectares), Alto Paranaíba (211 mil hectares) e Triângulo Mineiro (167 mil hectares). Nos últimos 3 anos, a produtividade quase dobrou nas lavouras mineiras, sendo os municípios de Uberaba, no Triângulo Mineiro e Unaí, no Noroeste do estado, os maiores produtores (Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do Estado de Minas Gerais - EMATER, 2009).

No entanto, existem fatores que podem prejudicar a produção, como, por exemplo, as doenças. O impacto das doenças na cultura do milho cresce anualmente, em razão do incremento de áreas irrigadas, bem como pela utilização da sucessão de cultura com o plantio de milho em safrinha e o plantio direto, procedimentos que favorecem a sobrevivência de patógenos necrotróficos

na área agrícola (Tomazela, 2005). O fungo *Stenocarpella maydis* se enquadra nesse grupo de microrganismos, apresentando uma fase parasítica na planta e outra como saprófita nos restos culturais. Dessa forma, pode facilmente ser encontrado em sementes, fora do período de cultivo, na forma de micélio (McGee, 1988; Casa, 1997). Após a colheita, picnídios e conídios, presentes nos colmos, palha da espiga, sabugo e grãos remanescentes, podem ser facilmente encontrados nas lavouras de milho (Smith & White, 1988; Reis & Casa, 1996).

Como alternativas de controle da referida doença, o tratamento de sementes é considerado uma das medidas mais importantes para manter a qualidade fisiológica e o vigor das sementes de milho, a exemplo do que ocorre com outros cultivos de interesse no país. Existem três modalidades para o tratamento de sementes: físico, químico e biológico. O tratamento químico apresenta como uma das vantagens a promoção do contato do produto com toda a superfície da semente, além da economia, haja vista as baixas concentrações do princípio ativo utilizadas (Machado, 2000).

Entretanto, com o uso intensivo desses produtos no controle das doenças e pragas na agricultura, aliado aos elevados custos e riscos ambientais (desequilíbrio ecológico) e toxicológicos (elevada concentração nos alimentos), a busca de substitutos se torna necessária. Algumas plantas mostram-se como alternativa de interesse econômico e ecológico bastante promissor, por meio do uso de seus óleos essenciais, por exemplo, que têm sido fonte de inúmeras pesquisas (Hernandez et al., 1998; Owolade et al., 2000; Morais, 2004). Dessa forma, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de alguns óleos essenciais no tratamento de sementes de milho inoculadas com *Stenocarpella maydis*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos morfológicos e taxonômicos de *Stenocarpella maydis*

Os agentes causadores da podridão do colmo e espigas de milho, *Stenocarpella maydis* (Berk.) Sutton [Sin. *Diplodia maydis* (Berk.) Sacc., *D. Zeae* (Schw.) Lev.] e *Stenocarpella macrospora* (Earle) Sutton [Sin. *D. macrospora* Earle in Bull.], são fungos que pertencem ao phylum Ascomycota, à classe Ascomycetes, à ordem Dothideales, à família Botryosphaeriaceae e ao gênero Botryosphaeria (Denman et al., 2000; Burges et al., 2003), embora a fase sexuada ainda não tenha sido relatada para nenhuma dessas espécies de *Stenocarpella*.

*Stenocarpella maydis* apresenta picnídios subepidérmicos, globosos ou alongados, com coloração marrom-escuro a preta, paredes grossas, diâmetro de 150 a 300 µm e um ostíolo protuberante papilado. Os conidióforos são usualmente ausentes. Apresentam células conidiogênicas enteroblásticas, filídicas, cilíndricas, variando de 10 a 20 x 2 a 3 µm, formadas nas células internas da parede do picnídio. Os conídios são pardo-oliva a pardos, cilíndricos, fusiformes, retos a ligeiramente curvados, medindo 15 a 34 x 5 a 8 µm e comumente com 1 septo (Sutton, 1980).

### 2.2 Histórico e relações patogênicas de *Stenocarpella maydis* em milho

O fungo *S. maydis* foi descrito pela primeira vez em 1884, como *Diplodia maydis*, nos Estados Unidos (Saccardo, 1944). Desde então, foi relatado em todas as regiões produtoras de milho (Farr et al., 1989).

Historicamente, nos Estados Unidos, a podridão do colmo e espigas de milho, causada por *S. maydis*, foi uma importante doença até 1960 e tornou-se rara nos anos seguintes, até o início de 1970 (Wilcoxson, 1962; Hooker & White, 1976). Estes autores atribuíram esse declínio à especificidade desse

fungo ao hospedeiro, à introdução de cultivares híbridas tolerantes e ao sistema norte-americano de produção de sementes. Neste país, especialmente no estado da Flórida, Eddins (1930) analisou 618 amostras de plantas de milho e constatou a presença de *S. maydis*, *S. macrospora* e *Diplodia frumenti*, em 80,3%, 16,5% e 3,2% das amostras, respectivamente. Em 1959, no estado de Illinois, Hooker & White (1976) relataram a ocorrência de *S. maydis* em 86,3% dos campos avaliados. Entretanto, em 1975, esse fitopatógeno foi encontrado em apenas 5,0% das lavouras.

No Brasil, o primeiro relato da ocorrência de podridão em sementes, causada pelo fungo *S. macrospora*, foi feito por Johann (1935), no estado de São Paulo. Apesar da existência de trabalhos relacionados a *S. maydis* e a *S. macrospora* na literatura nacional, a prova de patogenicidade e a mensuração das estruturas reprodutivas somente foram realizadas em 1997, por Casa, ao estudar o efeito da associação desses dois fitopatógenos às sementes de milho.

Machado et al. (2001) foram os primeiros a demonstrar a infectividade de *S. maydis* em sementes de milho, utilizando a técnica do condicionamento osmótico ou restrição hídrica. Em outro trabalho, Carvalho et al. (2004) também verificaram a patogenicidade desse fungo em sementes de milho, inoculadas artificialmente.

As podridões do colmo e espigas de milho, causadas pelo complexo *Stenocarpella*, são consideradas as doenças mais importantes dessa cultura. A ocorrência é variada e dependente das precipitações pluviais e da temperatura. Além disso, ocorre em todas as regiões de cultivo, devido à eficiente transmissão deste patógeno pelas sementes e por ocorrer nas regiões produtoras de sementes.

O quadro sintomatológico da podridão do colmo inclui a descoloração parda do colmo, parte interna dos nós e a desintegração da medula, deixando apenas os feixes vasculares intactos. Isso interfere no desenvolvimento normal da planta, fragiliza a base do colmo, ocasionando acamamento e morte

prematura das plantas (Chambers, 1988; Reis & Casa, 1996). Tal fato compromete o enchimento dos grãos e a produtividade. O acamamento de plantas, além de dificultar a colheita mecânica, permite o contato direto da espiga com o solo, o que favorece a contaminação por fungos de armazenamento e compromete a qualidade dos grãos. No Brasil, segundo Reis & Casa (1996), a ocorrência desses fungos em lavouras de milho é mais frequente na região sul.

Nazareno (1989), ao avaliar as perdas ocasionadas por podridão do colmo em milho, verificou redução de até 26,4 % na produtividade, dependendo do ano, do local e do híbrido utilizado.

No estado do Tocantins, Morello et al. (1994), na safra 1993/94, observaram que 15,9% das espigas de 42 híbridos de milho de ciclo normal apresentavam sintomas de podridão. Dentre essas, 75,5% estavam infectadas por *Fusarium* sp. e 19,1% por *Stenocarpella* sp.

Nas safras 1997/98 e 1998/99, Denti (2000), estudando os efeitos da monocultura e da rotação de culturas na incidência e nos danos causados por podridão do colmo, verificou que *S. maydis* foi, em ordem de incidência, o segundo fungo isolado. Na safra 2001/02, no sul do estado de Minas Gerais, foi constatada, por Freitas et al. (2003), redução de até 55,07% em lavouras comerciais de milho, ocasionadas, principalmente, por podridão do colmo e espigas causada por *S. macrospora* e *S. maydis*.

Esses fitopatógenos, além de afetarem o valor nutricional dos grãos, podem produzir micotoxinas que alteram a qualidade final da ração e o valor econômico dos grãos. Na África do Sul, foi relatada a intoxicação de aves, ovelhas e ruminantes, alimentados por grãos colonizados por *S. maydis*, designada diplodiose, causada por uma micotoxina ainda não identificada (Rabie et al., 1987; Kellerman et al., 1991).

### **2.3 Aspectos epidemiológicos**

Estudos sobre doenças de milho e sua relação com as sementes, realizados por McGee (1988), mostraram que *S. maydis* veiculado por sementes pode ser transmitido à plântula. Esse autor concluiu que as sementes infectadas constituem importante fonte de inóculo primário.

Outra importante fonte de inóculo primário são os resíduos culturais de milho infectados, remanescentes na superfície após a colheita, tanto para as podridões do colmo quanto para as manchas foliares de diplodia (Smith & White, 1988; Reis & Casa, 1996; Casa et al., 2004). Ao avaliar a influência de sistemas de cultivo nas podridões do colmo causadas por diplodia, na África do Sul, Flett et al. (1998) verificaram que a incidência de podridão de espigas e a quantidade de resíduo na superfície apresentaram relação linear positiva.

O sistema de plantio direto favorece a sobrevivência de fungos necrotróficos, devido ao maior tempo de decomposição dos restos culturais remanescentes na superfície do solo (Costamilan et al., 1999; Casa, 2000). O fungo *S. maydis* sobrevive saprofiticamente nos restos culturais de milho por até 29 meses, colonizando os tecidos celulares e formando picnídios subepidérmicos (Casa, 2000). Dessa forma, os propágulos encontram-se posicionados de maneira ideal para a esporulação, liberação, dispersão e infecção das plantas de milho em lavouras subsequentes. Isso justifica a maior incidência dessa doença em sistema de monocultura do milho (Flett & Wehner, 1991; Flett et al., 1998; Casa et al., 2000).

### **2.4 Medidas de controle de *Stenocarpella***

O controle ocorre com o uso de cultivares resistentes e a escolha de época e local de plantio mais adequados, com ambientes mais quentes e secos, no caso de uso de cultivares susceptíveis. O tratamento químico de sementes

também tem sido recomendado e um dos produtos mais utilizados é o thiabendazole (Carvalho et al., 2004).

Em lavoura de plantio direto, conduzida sob rotação de culturas, o controle de diplodia deve ser, obrigatoriamente, feito pelo uso de semente sadia e ou pelo tratamento de semente com fungicida que leve à erradicação do fungo. O tratamento de sementes de milho com fungicidas tem como objetivo controlar fungos associados à semente e protegê-las contra aqueles provenientes do solo (Reis et al., 1995; Pinto, 1998). A finalidade do controle é prevenir a deterioração da semente e evitar a transmissão do patógeno das sementes infectadas para as plântulas, evitando ou reduzindo a intensidade de podridões de raízes e da base do colmo. A erradicação de *S. maydis* pelo tratamento de sementes de milho pode ser obtida com o uso de fungicidas do grupo dos benzimidazóis, utilizando-se a dose de 40 a 50 g de ingrediente ativo para 100 kg de sementes (Casa et al., 1998).

Na literatura, não foram encontrados trabalhos relacionados ao controle dessa doença, utilizando óleos essenciais. No entanto, outros trabalhos têm mostrado o potencial de óleo e extratos de plantas no controle de fitopatógenos. Como exemplos, têm-se a utilização de extratos vegetais de alho e capim-santo, que reduziram a taxa de crescimento micelial e a germinação de esporos de *Fusarium proliferatum* a partir da dose de 2,5% (Souza et al., 2007). Emprego de extratos aquosos, hidroalcoólicos e etanólicos e óleos essenciais de alho mostraram o efeito inibitório deste sobre a germinação de esporos de *F. oxysporum* (Morais, 2004) e os extratos etanoicos e óleo essencial de capim-santo inibiram o crescimento micelial e a germinação de esporos de *Fusarium* spp. (Bolkan & Ribeiro, 1991; Cruz et al., 1997).

Segundo Medina et al. (1995), o tratamento de sementes tem sido efetivo reduzindo a incidência de fungos e preservando-lhes o poder germinativo. A ação de alguns vegetais, como o extrato de manjerição (*Ocimum*

*basilicum* L.) (Duke et al., 1989) e óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus* Staupf) (Viegas et al., 2005), tem se mostrado eficaz no controle do gênero *Aspergillus*. Estudos realizados também por Cruz et al. (1997) mostraram que o tratamento de sementes de soja (*Glycine max*) com extrato aquoso de manjeriço (*Ocimum basilicum*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) reduziu significativamente a incidência de *Aspergillus* sp.

Os óleos essenciais de alho e de canela, possivelmente, possuem um princípio ativo com ação fungicida, conforme constatado também por Bolkan et al. (1991), avaliando a toxicidade de extrato de alho sobre *Fusarium moniliforme* e *Rhizoctonia solani*. Wilson et al. (1997) constataram que o extrato do gênero *Allium* e o óleo essencial de *Cinnamomum zeilanicum* demonstraram boa atividade antifúngica sobre *Botrytis cinerea*. Lobato et al. (2007) verificaram a eficácia do óleo essencial de *Piper aduncum* L. no combate de fungos prejudiciais a sementes de caupi.

## **2.5 Aplicação da microscopia eletrônica no estudo da interação planta – patógeno**

A maioria dos eventos que levam ao estabelecimento de relações parasíticas ou à resistência do hospedeiro ocorre em âmbito celular, tanto do patógeno como da planta hospedeira. Detalhes de tais modificações têm sido obtidos por meio de estudos bioquímicos, enzimológicos e moleculares, mas sua visualização só tem sido possível por meio dos estudos morfológicos. Para se visualizar tais processos de infecção, os microscópios de luz (ML), o microscópio eletrônico de transmissão (MET) e o microscópio eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições. Esses instrumentos representam importantes ferramentas para o entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da

adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das reações das plantas a esses agentes (Alves et al., 2008).

Mclean & Byth (1980) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de urediniósporos de *P. pachyrhizi* em cultivares de soja suscetíveis, resistentes e altamente resistentes (Tainung-3, Tainung-4 e PI-200492). Em todas as cultivares não foi encontrada nenhuma diferença em relação ao desenvolvimento do tubo germinativo; houve diferença na porcentagem de urediniósporos germinados, formação de apressório e penetração. As cultivares Tainung-3 e Tainung-4 apresentaram-se resistentes à germinação dos urediniósporos, portanto, a resistência desses cultivares é de pré-penetração e penetração e a cultivar PI-200492 não apresentou resistência à germinação dos urediniósporos, pois eles germinavam e penetravam no tecido do hospedeiro, mas não conseguiam desenvolver. Portanto, essa resistência ocorre na fase de pós-penetração.

Outro fator importante que pode levar à resistência das cultivares são as substâncias químicas e a topografia das folhas. Allen et al. (1991) aplicaram as microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e de transmissão (MET) para estudar estes fatores em 27 espécies de fungos ferruginosos, dentre eles, *P. pachyrhizi*. Eles perceberam que, em locais da folha nos quais as diferenças no plano topográfico atingiam aproximadamente 0,4-0,8  $\mu\text{m}$ , o fungo desenvolvia-se muito bem e, em locais de depressão, onde as diferenças eram inferiores ao número acima, a formação de apressório era reduzida. Esses fatores estão diretamente ligados à orientação e ao crescimento do tubo germinativo.

Bonde et al. (1976) e Koch et al. (1983) utilizaram a ML, MEV e MET, respectivamente, para estudar o desenvolvimento de *P. pachyrhizi* em folhas de cultivares de soja suscetíveis e descreveram os vários eventos que ocorrem nesta interação. Adendorff & Rijkenberg (2000) aplicaram a MEV no estudo do

processo de infecção de outra espécie de *Phakopsora*, *P. apoda*, mostrando que o processo é bem semelhante ao de *P. pachyrhizi*.

Magnani et al. (2007), por meio de técnicas de ML e MEV, estudaram eventos desde a inoculação de urediniósporos de *P. pachyrhizi* até a formação de soros urediniais em folíolos de sete cultivares de soja.

Bensch & Staden (1992) utilizaram a MEV e MET para o estudo do modo de penetração e colonização de *S. maydis* em colmos e folhas de milho. Brunelli et al. (2005) observaram alguns eventos de germinação e penetração de *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho por meio da microscopia eletrônica de varredura.

Vários outros exemplos existem na literatura com a aplicação da microscopia eletrônica no estudo de vários patossistemas.

Dessa forma, a compreensão dos mecanismos da interação deste patógeno com o milho torna-se de suma importância para fornecer subsídios para os programas de melhoramento e para o conhecimento do modo de ação dos óleos essenciais, os quais podem ser aplicados em programas de manejo que procurem medidas que minimizem os danos ao ambiente.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia de Sementes, em Casa de Vegetação e no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA). Os óleos essenciais foram comprados da Brasilpotrait.

#### 3.1 Obtenção e cultivo do isolado

O fungo *Stenocarpella maydis* foi obtido por meio de sementes já infectadas com o patógeno, as quais foram incubadas pelo método *Blotter-test*. Após o aparecimento do patógeno, foi retirada parte do micélio do fungo, transferido e cultivado em meio de cultura batata, dextrose, ágar (BDA) (200g, 10g e 20g), a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas, em câmara de crescimento.

#### 3.2 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Stenocarpella maydis*

A avaliação da inibição da germinação de esporos foi feita utilizando-se placas de ELISA para acondicionar os tratamentos e a contagem em microscópio de luz. Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os óleos essenciais de citronela, tomilho, capim-limão, eucalipto, canela e cravo, nas concentrações de 0,05%, 0,2%, 0,35% e 0,5% mais a testemunha (água destilada esterilizada) e o fungicida fludioxonil (Maxim XL<sup>®</sup>), na concentração de 0,1%, com oito repetições. Em cada orifício da placa foram adicionados 40 µL da solução de óleo e 40 µL da suspensão de conídios ajustada para 10<sup>4</sup> conídios mL<sup>-1</sup>. Após 15 horas de incubação a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas, realizaram-se a paralisação da germinação de conídios e a contagem direta de 50 conídios por orifício, totalizando 400 por tratamento.

Para a avaliação do crescimento micelial, foram preparadas placas com o meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar). Foi feita uma pré-mistura do óleo na água usando Tween 20 a 1%, no qual 1 mL dessa solução foi misturado a 9 mL do meio de cultura BDA autoclavado a 121°C e 1 ATM, por 20 minutos, de modo a se obter o meio com as diferentes concentrações dos produtos a serem avaliados. Foram testados os mesmos óleos citados anteriormente, porém, em concentrações diferentes. Adotou-se também o delineamento inteiramente casualizado (DIC), sendo os óleos essenciais de citronela, tomilho, capim-limão, eucalipto, canela e cravo, nas concentrações de 0,1%, 0,5%, 1,0% e 2,0% mais a testemunha e o fungicida fludioxonil (Maxim XL<sup>®</sup>) a 0,1%, com quatro repetições. Em cada placa foi introduzido, no centro, um disco de 6 mm de diâmetro, contendo micélio da cultura crescida 7 dias em BDA. As placas também foram acondicionadas em estufa incubadora, a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. A testemunha constituiu-se do disco do micélio do fungo sobre o meio de cultura constituído e 9 mL de BDA mais 1mL água destilada estéril mais Tween 20 a 1%, e outra com o fungicida fludioxonil. As avaliações foram realizadas por meio de medições diárias do diâmetro das colônias (média das duas medidas diametricamente opostas), iniciando-se 24 horas após o preparo das placas e sempre no mesmo horário. As laterais das placas foram vedadas com filme plástico. As avaliações foram realizadas até o sétimo dia de incubação. Os dados foram convertidos em índice de velocidade média de crescimento micelial, por meio da fórmula proposta por Oliveira (1991).

$$\sum [(x_2-x_1)/1 + (x_3-x_2)/2 + \dots + (x_n-x_{n-1})/N], \text{ em que:}$$

$x_n$  - diâmetro médio da colônia, no dia seguinte;

$x_{n-1}$  - diâmetro médio da colônia, no dia;

N - número de dias que a colônia cresceu.

Os dados foram analisados pelo programa SISVAR, utilizando o teste de média de Scott-Knott, a 5% de significância.

Outro ensaio foi montado para determinar a concentração inibitória em uma faixa abaixo daquela testada anteriormente. Foram testados os mesmos seis óleos essenciais, porém, nas concentrações 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025% e 0,0125%. Cada óleo essencial foi diluído em meio de cultura líquido batata dextrose (BD), com 1% de Tween 20. Os tratamentos foram adicionados em orifícios de placa ELISA, com três repetições. Utilizou-se, como padrão positivo, um tratamento composto pelo fungicida fludioxonil (Maxim XL<sup>®</sup>), nas concentrações de 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025% e 0,0125% e, como padrão de referência de crescimento micelial, duas testemunhas, uma composta apenas pelo meio líquido BD e outra por meio líquido BD adicionado de 1% de Tween. As concentrações finais dos óleos essenciais de 0,2%, 0,1%, 0,05%, 0,025% e 0,0125% foram obtidas por meio da adição de uma suspensão de conídios de *S. maydis*, a  $2,5 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ . Em seguida, as placas foram incubadas em BOD, a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas. Prosseguiu-se a avaliação do crescimento micelial, pela observação a olho nu, 84 horas após a incubação.

### 3.3 Inoculação das sementes

As sementes do híbrido BX945, suscetível à *Stenocarpela maydis*, foram inoculadas com o isolado obtido anteriormente. Para isso, utilizou-se a técnica de restrição hídrica descrita por Machado et al. (2004), com as seguintes modificações: inicialmente, foi preparado um meio BDA (extrato de 200 g de batata mais 20 g de dextrose e 20 g de ágar por litro de água destilada). Ao meio foi adicionado manitol em quantidade suficiente para se obter o potencial osmótico de -1,4 MPa, calculado conforme o programa SPPM (Michel & Radcliffe, 1995). Placas de Petri de 15 cm de diâmetro foram utilizadas para a inoculação. Verteram-se 30 mL do meio BDA modificado osmoticamente em cada placa e, posteriormente, transferiram-se cinco discos de micélio da cultura crescida por sete dias em BDA. Decorridos mais sete dias, quando a placa

encontrava-se tomada pelo fungo, acrescentou-se, sobre a cultura fúngica, uma camada de sementes previamente desinfestadas com hipoclorito de sódio a 1%, por 2 minutos. As placas foram acondicionadas em estufa incubadora, a 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Após 96 horas de incubação, as sementes foram retiradas e colocadas para secar em papel germitest, à temperatura ambiente.

#### **3.4 Avaliação dos efeitos dos óleos essenciais na incidência de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas artificialmente e sobre a germinação e o vigor das sementes**

Para este estudo, foram utilizados os óleos essenciais de cravo, canela e tomilho, na dosagem de 0,1%. Portanto, este ensaio foi montado em delineamento inteiramente casualizado, totalizando sete tratamentos, com quatro repetições. Os tratamentos consistiram dos três óleos essenciais e o fungicida na dose de 0,1%, a testemunha inoculada, a testemunha apenas com manitol e uma terceira testemunha, representando o lote de sementes original.

Após a inoculação, o material foi subdividido em sete amostras, cada uma com duzentas sementes, que foram imersas, separadamente, em soluções correspondentes aos tratamentos anteriormente descritos, durante cinco minutos, secas sobre papel de filtro esterilizado, por trinta minutos. Posteriormente, as sementes foram incubadas em substrato de papel (*blotter test*), por 14 dias e, em seguida, observadas sob microscópio estereoscópio e óptico, para a determinação da incidência de *S. maydis*.

Foi realizado, em laboratório, o teste padrão de germinação (Brasil, 2009).

Para a avaliação do vigor das sementes tratadas e não tratadas, foram realizados os testes de emergência (IVE) e de frio. Para o teste de emergência, as sementes, após serem desinfestadas com solução de hipoclorito de sódio 1,0%, por dois minutos e inoculadas posteriormente, foram tratadas, em separado, com

óleos essenciais de cravo, canela e tomilho, mais o fungicida, como descrito no item 4. As testemunhas constituíram-se de sementes desinfestadas e inoculadas, sementes com manitol e não inoculadas e sementes não inoculadas. Para o teste de emergência, realizou-se a semeadura em bandejas de plástico contendo 5 L do substrato Plantmax<sup>®</sup> e areia (2:1), já esterilizados. Foram realizadas contagens diárias do número de plântulas emergidas, constituindo elementos para a obtenção do IVE por meio da fórmula de Maguire (1962).

$IVE = E_1/N_1 + E_2/N_2 + \dots + E_n/N_n$ , em que:

IVE = índice de velocidade de emergência;

$E_1, E_2, E_n$  = número de plântulas emergidas na primeira, segunda e última contagem;

$N_1, N_2, N_n$  = número de dias a partir da semeadura.

O início do aparecimento do coleóptilo foi o critério adotado para se considerar uma plântula de milho emergida.

Fez-se também a avaliação do estande inicial, aos 10 dias após a semeadura e do estande final, aos 28 dias após a semeadura. O experimento foi conduzido em câmara de crescimento à temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Pelo teste de emergência, as plantas com 28 dias após a semeadura (d.a.s.) foram seccionadas na região do coleto, separando-se a parte aérea das raízes e colocadas em sacos de papel. Em seguida, foram levadas para secagem em estufa, a 60°C, com circulação forçada de ar, por um período de 48 horas. Depois disso, pesou-se o material utilizando balança digital.

Para o teste de frio, foram utilizadas bandejas contendo 5 L de substrato constituído pela mistura terra e areia, na proporção 2:1 (2 partes de terra para 1 parte de areia). A terra foi coletada de área anteriormente cultivada com milho. O fornecimento de água foi feito por meio do umedecimento, até atingir 70% da capacidade de retenção. Esse cálculo foi feito de acordo com as Regras para

Análise de Sementes (Brasil, 2009). As bandejas foram, em seguida, colocadas em câmara fria, a 10°C, na ausência de luz. Após sete dias, as mesmas foram transferidas para câmara de crescimento à temperatura de 25°C, sob fotoperíodo de 12 horas. Decorridos mais cinco dias, fez-se a contagem do número de plântulas emergidas.

### **3.5 Estudo dos eventos de pré-penetração e penetração de *Stenocarpella maydis* em tecidos foliares de milho tratados com óleos essenciais**

#### **3.5.1 Coleta das amostras para microscopia eletrônica de varredura**

O experimento foi realizado com folhas de milho destacadas de plantas cultivadas em casa de vegetação. Dois pedaços de, aproximadamente, 20 cm de folha foram dispostos em bandeja de plástico contendo papel de filtro umedecido com água destilada esterilizada e coberto com papel alumínio, sendo uma bandeja para cada produto testado. Foi colocada uma gota de 40 µL da suspensão ajustada para  $7,5 \times 10^4$  esporos/mL pré-misturada com a solução correspondente a cada tratamento. Os tratamentos consistiram dos óleos de cravo, canela e tomilho e o fungicida na concentração de 0,1% mais uma testemunha, apenas com a suspensão de esporos, em dez tempos de coleta e outra apenas com água. As gotas foram aplicadas em locais pré-definidos da superfície adaxial das folhas, de tal forma que possibilitou a realização das coletas de amostras com fragmentos de, aproximadamente, 0,5 cm de lado. As coletas foram realizadas às 3, 7, 11, 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 horas após a inoculação. Para cada tempo, os fragmentos coletados foram também fixados em solução Karnovsky modificada (2,5% de glutaraldeído e 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M - pH 7,2 e CaCl<sub>2</sub> 0,001M), por um período de, no mínimo, 24 horas e armazenadas a 4°C.

### **3.5.2 Preparo e observação das amostras para microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

Após o período de fixação primária do material, para ambos os testes, ele foi imerso em tampão cacodilato, por 3 vezes de 10 minutos para cada imersão e, após esse processo, foi transferido para uma solução de tetróxido de ósmio 1% em água por 1 hora, lavado em água destilada por três vezes e, subsequentemente, desidratado em uma série de acetona (25%, 50%, 75%, 90%, uma vez e 100% por três vezes). Posteriormente, foi levado para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO<sub>2</sub> e complementação da secagem. Os espécimes obtidos foram montados em suportes de alumínio, *stubs*, com fita de carbono dupla face colocada sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050 para serem observados em MEV LEO EVO 40 XVP. As imagens foram geradas, registradas e gravadas digitalmente, com posterior preparação de pranchas, utilizando o Software Corel Draw 12.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Pelos resultados da análise sanitária das sementes de milho, foram observados fungos dos gêneros *Penicillium* spp. (53,5%), *F. verticilioides* (17,5%), *Aspergillus* spp. (14,5%) e *Cladosporium* sp. (1,5%).

### 4.1 Efeito de óleos essenciais na germinação de conídios e no crescimento micelial de *Stenocarpella maydis*

Todos os tratamentos com óleos essenciais e o fungicida apresentaram valores estatisticamente inferiores ao da testemunha, que apresentou um percentual de germinação de conídios (GC) da ordem de 81,75%, com exceção do óleo de citronela a 0,05%, que promoveu estímulo da germinação de conídios atingindo 92%, superando a testemunha. Os óleos de cravo, tomilho e canela inibiram totalmente a germinação dos conídios em todas as concentrações, assim como os óleos de capim-limão e citronela, a 0,2%, 0,35% e 0,5%. Na presença de fludioxonil, a germinação de conídios foi de 26,5% e, na presença do óleo de eucalipto, a germinação variou na faixa de 35,5% a 65,75%, o que mostra um desempenho intermediário deste óleo em relação à testemunha e ao tratamento fungicida (Figura 1).

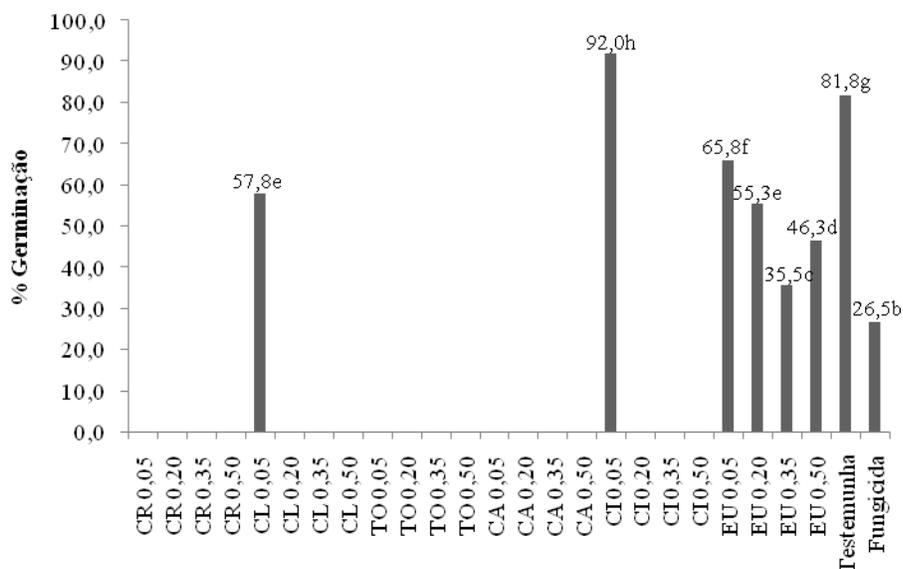


FIGURA 1 Efeito de óleos essenciais na porcentagem de germinação de conídios de *Stenocarpella maydis* em água. TO: tomilho; CR: cravo; CA: canela; CI: citronela; EU: eucalipto; CL: capim-limão.

Para o crescimento micelial, os tratamentos com óleo de citronela 1,0%, capim-limão 0,1% e eucalipto 0,1% e 0,5% não diferiram estatisticamente da testemunha água destilada esterilizada, que apresentou índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de 14,81. Os óleos de tomilho e cravo, em todas as concentrações, mais o fungicida, inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo. Já os óleos de canela e capim-limão mostraram melhor inibição a partir da concentração de 0,5% e o óleo de eucalipto, a partir de 2,0%. O óleo de citronela na menor concentração testada (0,1%), de forma semelhante ao ensaio da germinação de conídios, estimulou o crescimento micelial do fungo, quando comparado com a testemunha (Tabela 1).

Souza et al. (2007), testando extratos de alho (*Allium sativum* L.) e capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.), observaram efeito inibitório destes

no crescimento micelial e na germinação de conídios de *Fusarium proliferatum*, a partir da dose de 0,5%.

Viegas et al. (2005) observaram efeito inibitório dos óleos essenciais de sálvia, alho e canela no crescimento micelial de isolados de *Aspergillus flavus*. Lima et al. (2006), testando a atividade antifúngica de seis óleos essenciais sobre espécies de *Candida*, verificaram que o óleo de canela (*Cinnamomun zeylanicum* Blume) e boldo-do-chile (*Peumus boldus* Benth) inibiram o crescimento micelial de 58% das cepas ensaiadas.

TABELA 1 Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Stenocarpella maydis* em meio de cultura contendo diferentes óleos essenciais. TA: testemunha absoluta e FU: fungicida.

Óleos essenciais	Concentrações (%)							
	0,1		0,5		1,0		2,0	
Cravo	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
Tomilho	0,00	a	0,00	a	0,00	a	0,00	a
Canela	12,3	b	0,00	a	0,00	a	0,00	a
Capim-limão	14,1	c	0,00	a	0,00	a	0,00	a
Eucalipto	14,8	c	15,1	b	11,6	b	0,00	a
Citronela	24,6	d	20,4	c	13,9	c	1,4	a
TA	14,81	c	FU	0,00	a			

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

No ensaio para determinar uma menor faixa de concentração inibitória para o fungo, verificou-se que o óleo essencial de cravo inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo a partir da concentração de 0,025%. Os óleos de tomilho e canela inibiram a partir de 0,05%; os de citronela e de capim-limão a partir de 0,1% e o óleo de eucalipto inibiu apenas na concentração de 0,2%, visto que nenhum crescimento micelial foi detectado após incubação, quando comparado com as testemunhas contendo apenas meio líquido BD e outra contendo BD mais Tween a 1%, caracterizando um efeito direto sobre o fungo.

O fungicida fludioxonil apresentou inibição em todas as concentrações testadas (Tabela 2). Com isso, observa-se o potencial de alguns óleos no possível controle da doença, permitindo a extrapolação das concentrações usadas para condições de campo, ao comparar o resultado obtido no tratamento composto por diluições do fungicida.

TABELA 2 Frequência absoluta do crescimento micelial de *Stenocarpella maydis* em meio de cultura contendo óleos essenciais e o fungicida.

Concentração (%)	TO	CR	CA	CI	EU
0,2	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o
0,1	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	x x x x x x x x x x
0,05	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x
0,025	x x x o o o x x x x	x x x o o o x x x x	x x x o o o x x x x	x x x o o o x x x x	x x x o o o x x x x
0,0125	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x
	CL	FC	FE	TA	TT
0,2	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x
0,1	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	o o o o o o o o o o	x x x x x x x x x x	x x x x x x x x x x
0,05	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o
0,025	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o
0,0125	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o	x x x o o o o o o o

TO: tomilho; CR: cravo; CA: canela; CI: citronela; EU: eucalipto; CL: capim-limão; FC: fungicida sob luz; FE: fungicida no escuro; o: sem crescimento fúngico; x: com crescimento fúngico.

Esses resultados confirmam que os óleos essenciais de cravo-da-índia, canela e tomilho, mesmo em concentrações mais baixas, apresentam ação fungitóxica contra *Stenocarpella maydis* e, portanto, devem ser mais bem explorados quanto às suas formas de utilização e modo de ação.

#### 4.2 Efeito de óleos essenciais sobre a incidência de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas artificialmente e sobre a germinação e o vigor das sementes

Sementes tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia proporcionaram um percentual de germinação de 89,0%, não diferindo estatisticamente das testemunhas não inoculada (93,0%) e não inoculada mais manitol (92,0%), ao passo que o óleo essencial de canela e o fungicida proporcionaram uma germinação intermediária de 84,5%. Já o óleo de tomilho não diferiu estatisticamente da testemunha inoculada, apresentando germinação de 77,5% e 76,5%, respectivamente (Tabela 3). Portanto, a inoculação das sementes com *S. maydis* reduziu a germinação em 21% e nenhum dos tratamentos foi capaz de eliminar completamente o fungo das sementes.

TABELA 3 Porcentagem de germinação e vigor (IVE e teste de frio) e incidência de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho inoculadas artificialmente e tratadas com óleo essenciais. TI: testemunha inoculada; TM: testemunha apenas com manitol e TNI: testemunha não inoculada.

Tratamentos	Germinação (%)	Incidência (%)	Teste de frio (%)	IVE (%)
Cravo	89,0 c	39,0 c	62,5 b	24,0 a
Canela	84,5 b	28,0 b	61,5 b	23,7 a
Tomilho	77,5 a	55,5 d	67,0 b	23,4 a
Fungicida	84,5 b	40,0 c	72,5 b	24,7 a
TI	76,5 a	57,0 d	69,5 b	25,2 a
TM	92,0 c	0,0 a	40,5 a	25,1 a
TNI	93,0 c	0,0 a	78,0 b	26,4 a
CV (%)	3,51	20,19	12,08	7,87

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

Esse dados corroboram os de Bressan & Figueiredo (2005). Estes autores testaram isolados de *Streptomyces* sp. no controle de *S. maydis* em sementes de milho e verificaram que o patógeno reduziu a germinação de

sementes de milho em 20% e, também, que nenhum dos tratamentos utilizados foi capaz de eliminar completamente o fungo das sementes.

Nas sementes não inoculadas, não foi observada a presença do patógeno. Verificou-se menor incidência de *S. maydis* no tratamento com o óleo essencial de canela (28%), seguido pelo óleo de cravo (39,0%), que não diferiu estatisticamente do fungicida (40,0%). Já a testemunha inoculada apresentou 57,0% de incidência (Tabela 3).

Souza et al. (2007), testando extratos de alho (*Allium sativum* L.) e capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf.) contra *Fusarium proliferatum*, observaram aumento de até 24% na germinação das sementes, quando comparados com a testemunha e queda de até 87% na incidência desse patógeno, quando utilizaram a dose de 0,5%.

Observou-se também que as sementes não inoculadas, que foram submetidas ao restritor hídrico manitol, sofreram envigoroamento (efeito *priming*, condicionamento osmótico ou condicionamento fisiológico). Esse efeito foi observado por Teixeira (2001), ao avaliar a transmissibilidade e o efeito de *Acremonium strictum* em sementes de milho, utilizando a restrição hídrica convencional no mesmo potencial osmótico.

Para os testes de emergência e de frio, não foi verificada diferença estatística em nenhum dos tratamentos, exceto para as sementes submetidas ao manitol que, no teste de frio, apresentou taxa de emergência (40,5%) estatisticamente inferior à dos demais tratamentos.

Com exceção da testemunha absoluta, todos os demais tratamentos não diferiram estatisticamente entre si, em se tratando de estande inicial, aos dez dias após a semeadura. Resultado semelhante foi observado para o estande final, aos 28 dias após a semeadura, no qual a testemunha submetida ao restritor hídrico manitol não diferiu estatisticamente da testemunha absoluta e apresentou estande superior aos demais. Entretanto, todos os tratamentos apresentaram menor taxa

de redução de estande (estande final – estande inicial), quando comparados com a testemunha inoculada (24,39%), sendo os óleos essenciais de cravo, canela e tomilho, com redução 8,92%, 11,69% e 12,42% , respectivamente, seguidos pelo fungicida, com 17,18%. Já a testemunha apenas com manitol e a testemunha absoluta obtiveram queda de estande de apenas 4,14% e 4,89%, respectivamente (Tabela 4).

TABELA 4 Óleos essenciais na variação de estande de plantas de milho inoculadas artificialmente com *Stenocarpella maydis*, dos 10 (estande inicial) aos 28 (estande final) dias após a semeadura. TI: testemunha inoculada, TM: testemunha apenas com manitol e TNI: testemunha não inoculada.

Tratamentos	Estande inicial (%)	Estande final (%)	Queda estande (%)
Cravo	78,5 a	71,5 a	8,92 b
Canela	77,0 a	68,0 a	11,69 b
Tomilho	76,5 a	67,0 a	12,42 b
Fungicida	81,5 a	67,5 a	17,18 c
TI	82,0 a	62,0 a	24,39 d
TM	84,5 a	81,0 b	4,14 a
TNI	92,0 b	87,5 b	4,89 a
CV (%)	5,60	7,76	33,34

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

Em se tratando de matéria seca, tanto de parte aérea quanto do sistema radicular, não foi observada diferença estatística entre os tratamentos (Tabela 5).

TABELA 5 Peso seco da parte aérea (PSPA), raiz (PSRA) e total PSTO) de plântulas de milho inoculadas com *Stenocarpella maydis* e tratadas com óleos essenciais.

Tratamentos	PSPA	PSRA	PSTO
Cravo	9,73 a	7,32 a	17,04 a
Canela	8,44 a	8,39 a	16,83 a
Tomilho	9,43 a	7,95 a	17,37 a
Fungicida	7,95 a	6,25 a	14,19 a
TI	8,39 a	5,14 a	13,53 a
TM	10,34 a	8,17 a	18,51 a
TNI	10,25 a	11,05 a	21,30 a
CV (%)	15,64	27,27	17,96

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

Isso pode ter ocorrido pelo fato de o ensaio ter sido conduzido em bandejas, nas quais há pouco espaço e as plântulas/plantas crescem muito próximas entre si, proporcionando aumento significativo da competição por água, luz e nutrientes.

#### 4.3 Eventos de pré-penetração e penetração de *Stenocarpella maydis* em tecidos foliares de milho tratados com óleos essenciais

Em tecidos não tratados, não foi verificada germinação dos conídios às 3 horas após a inoculação (h.a.i.) (Figura 2A). O início deste processo foi observado a partir de 7 h.a.i. (Figura 2B), sendo mais expressivo entre 11 e 15 horas, quando foram observados 87,5% de conídios germinados (Figura 2C). O início da formação de apressório se deu entre 11 e 20 h.a.i. e a penetração do fungo foi verificada a partir das 20 h.a.i. (Figuras 2D e 2F). Após 25 horas, verificou-se 92% dos conídios germinados e 50% com apressório. A partir de 35 h.a.i., observaram-se alongação do tubo germinativo e maior desenvolvimento das estruturas de penetração (Figura 2E).

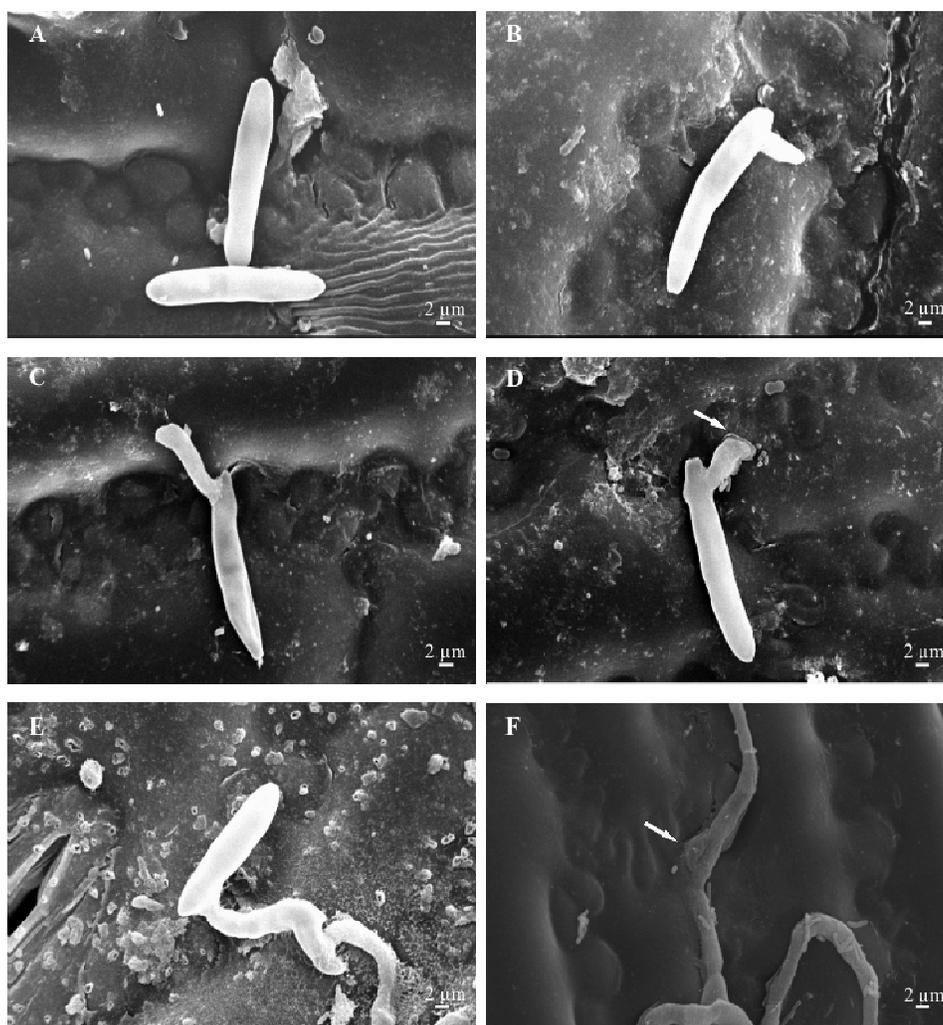


FIGURA 2 Eletromicrografia de varredura de folhas de milho inoculadas com *Stenocarpella maydis*. **A.** Conídio não germinado (3 h.a.i.). **B.** Conídio em início de germinação (7 h.a.i.). **C.** Início da formação do apressório (11 h.p.i.). **D.** Apressório formado (20 h.a.i.). **E.** Elongação do tubo germinativo (30 h.a.i.). **F.** Penetração do fungo via apressório (20 h.p.i.).

Em folhas tratadas com os óleos essenciais de canela, cravo-da-índia e tomilho, a germinação dos conídios iniciou-se entre 11 e 15 h.a.i. Para os tratamentos com óleo essencial de canela e tomilho, a formação de apressório se

deu entre 15 e 25 h.a.i. e a elongação do tubo germinativo, às 20 h.a.i (Figura 3A). Porém, para folhas tratadas com óleo de cravo-da-índia, a formação de apressório foi verificada às 25 h.a.i., sem elongação do tubo germinativo (Figura 3B). Para os tratamentos com os óleos de cravo-da-índia e tomilho, às 30 h.a.i., verificou-se murcha em alguns tubos germinativos e estruturas de penetração (Figura 3C).

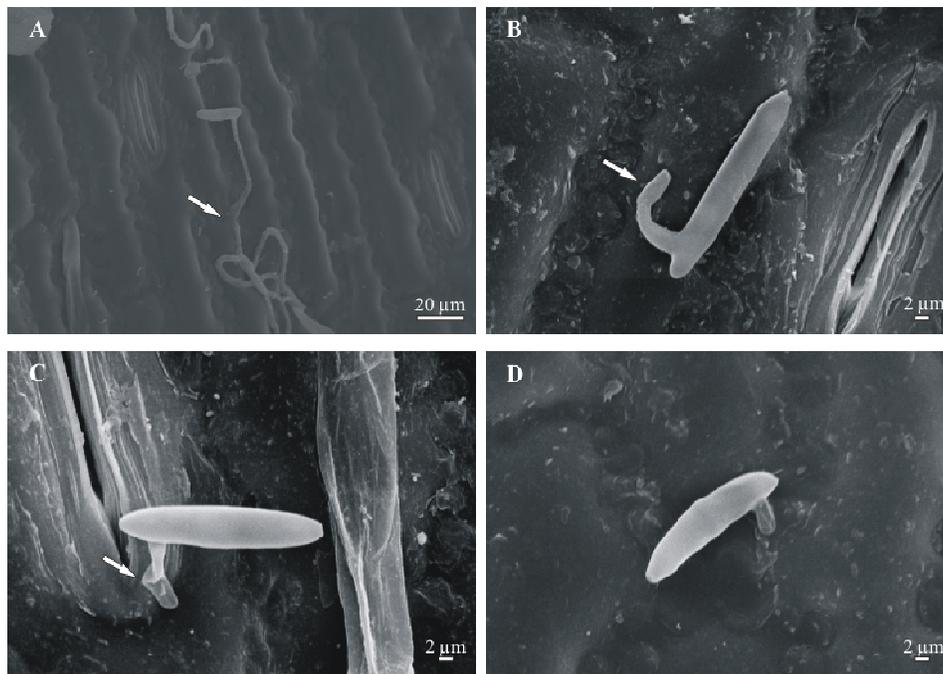


FIGURA 3 Eletromicrografia de varredura em folhas de milho inoculadas com *Stenocarpella maydis* e tratadas com óleos essenciais. **A.** Elongação do tubo germinativo e penetração via apressório em folhas tratadas com óleo essencial de canela (20 h.a.i.). **B.** Formação de apressório em folhas tratadas com óleo essencial de cravo-da-índia (25 h.a.i.). **C.** Murcha do tubo germinativo (30 h.a.i.). **D.** Início da germinação de conídios em folhas tratadas com fungicida (40 h.a.i.).

No tratamento com fludioxonil, foi observada uma pequena quantidade de conídios germinados somente às 30 h.a.i. Não foi verificada a presença de apressório nem alongação do tubo germinativo até às 45 h.a.i. (Figura 3D).

Bensch & Staden (1992), por meio de MEV e MET, constataram que a germinação de conídios de *S. maydis* em colmos e folhas de milho ocorreu após 5 horas de incubação a 30°C. Porém, a formação de apressório foi observada somente 72 horas após a incubação. Esse maior tempo para a formação do apressório pode estar relacionado com a temperatura de incubação, a qual foi superior a de 25°C, utilizada neste ensaio.

Medice et al. (2007), avaliando o potencial de óleos essenciais na inibição da germinação de esporos de *Phakopsora pachyrhizi*, verificaram que o óleo essencial de tomilho causou murcha em urediniósporos.

Brunelli et al. (2005), observando alguns eventos de germinação e penetração de *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho por meio da MEV, verificaram que 86% dos conídios germinaram entre 12 e 15 horas após a inoculação e a formação de apressório ocorreu às 18 h.a.i.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia, canela e tomilho, na concentração de 0,1%, mostraram-se como alternativa econômica e racional no combate ao fungo causador de podridão do colmo e espiga em milho, quando utilizados em tratamento de sementes. Os ensaios realizados demonstraram o elevado potencial desses óleos como agentes inibidores do desenvolvimento de colônias de *S. maydis in vitro*, bem como da proliferação deste nos tecidos da planta de milho. Portanto, o uso desses produtos pode assegurar uma melhor qualidade das sementes de milho e, conseqüentemente, garantir o estande final desejado, sem causar danos ao homem e ao meio ambiente.

Os óleos de capim-limão e citronela, em concentrações acima de 0,1%, podem ser úteis no controle de *S. maydis*, porém, estudos mais aprofundados

devem ser conduzidos para que se possa conhecer melhor o modo de ação destes.

O óleo de eucalipto, provavelmente, não é uma alternativa de controle economicamente viável no tratamento de sementes de milho contra *S. maydis*, uma vez que a possível concentração a ser utilizada seria alta, acarretando em custos mais elevados.

## 5 CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de cravo-de-índia, canela e tomilho, na concentração de 0,1%, são eficientes no controle de *Stenocarpella maydis* em sementes de milho.

Os óleos de tomilho e cravo-da-índia atuam diretamente sobre os conídios do fungo, retardando a germinação e a formação de apressório dos mesmos.

O óleo de eucalipto, quando utilizado no tratamento de sementes de milho para o controle de *S. maydis*, não é eficiente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENDORFF, R.; RYKENBERG, F. H. J. Direct penetration from uredospores of *Phakopsora apoda*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, n. 1, p. 317-324, Feb. 2000.

ALLEN, E.; HAZEN, B.; HOCH, C.; KWON, Y.; LEINHOS, G. M. E.; STAPLES, R. C.; STUMPF, M. A.; TERHUNE, B. T. Apressorium formation in response to topographical signals by 27 rust species. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 81, n. 3, p. 323-331, Sept. 1991.

ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008. p. 433-466.

BENSCH, M. J.; STADEN, J. van. Ultrastructural histopathology of infection and colonization of maize by *Stenocarpella maydis* (= *Diplodia maydis*). **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 136, n. 4, p. 312-318, May 1992.

BOLKAN, H. A.; RIBEIRO, W. R. C. Efeito do extrato e de óleos de alho em *Cylindrocladium clavatum*, *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans* e *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 6, n. 1, p. 565-566, mar. 1991.

BONDE, M. R.; MELCHING, J. S.; BROMFIEL, K. R. Histology of the susceptible pathogen relationship between *Glycine max* and *Phakopsora pachyrhizi* the cause of soybean rust. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 66, p. 290-1294, 1976.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Departamento de Produção Vegetal. Divisão de Sementes e Mudanças. **Regras para análises de sementes (RAS)**. Brasília, 2009. 365 p.

BRESSAN, W.; FIGUEIREDO, J. E. F. Biological control of *Stenocarpella maydis* in maize seed with antagonistic *Streptomyces* sp. isolates. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 10, p. 623-626, Oct. 2005.

BRUNELLI, K. R.; ATHAYDE SOBRINHO, C.; CAVALCANTI, L. S.; FERREIRA, P. T. O.; CAMARGO, L. E. A. Germinação e penetração *Stenocarpella macrospora* em folhas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 187-190, mar./abr. 2005.

BURGES, T.; WINGFIELD, M. J.; WINGFIELD, B. D. Development and characterization of microsatellite loci for the tropical tree pathogen *Botryosphaeria rhodina*. **Molecular Ecology Notes**, Oxford, n. 3, p. 91-94, 2003.

CARVALHO, E. M.; MACHADO, J. C.; PINHO, E. V. R. von; POZZA, E. A.; PRADO, P. E. R. Relação do tamanho de sementes de milho e doses de fungicida no controle de *S. maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 4, p. 389-393, out./dez. 2004.

CASA, R. T. ***Diplodia maydis* e *Diplodia macrospora* associados à semente de milho**. 1997. 71 f. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CASA, R. T. **Sobrevivência de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora* em restos culturais de milho**. 2000. 130 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; SEVERO, R.; DENTI, E.; TRENTO, S.; BLUM, M. M. C. Prevenção e controle de doenças na cultura do milho. In: SANDINI, I. A.; FANCELLI, A. L. **Milho: estratégias de manejo para a região sul**. Guarapuava: Fundação Agrária de Pesquisa Agropecuária, 2000. p. 29-38.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Fungos associados à semente de milho produzida nas regiões sul e sudeste do Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 3, p. 370-373, maio/jun. 1998.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; ZAMBOLIM, L. Dispersão vertical e horizontal de conídios de *Stenocarpella macrospora* e *Stenocarpella maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 2, p. 141-147, abr./jun. 2004.

CHAMBERS, K. R. Effect of time of inoculation on Diplodia stalk and ear rot of maize in South Africa. **Plant Disease**, Quebec, v. 72, n. 1, p. 529-531, Feb. 1988.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Indicadores da agropecuária**: dezembro/2009. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 22 fev. 2010.

COSTAMILAN, L. M.; LHAMBY, J. C. B.; BONATO, E. R. Sobrevivência de fungos necrotróficos em restos de cultura de soja, em sistema de plantio direto. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 24, n. 4, p. 175-177, jul./ago. 1999.

CRUZ, M. E. S.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Efeito do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim limão) no crescimento micelial de fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 23, p. 63-65, 1997.

DENMAN, S.; CROWS, P. W.; TAYLOR, J. E.; KANG, J. C.; PASCOE, I.; WINGFIELD, M. J. An overview of the taxonomic history of *Botryosphaeria*, and a re-evaluation of its anamorphs based on morphology and ITS rDNA phylogeny. **Studies in Mycology**, Berlin, v. 45, n. 2, p. 129-140, Nov. 2000.

DENTI, E. A. **Incidência de fungos, efeito das práticas culturais, reação de genótipos e quantificação de danos associados com as podridões da base do colmo do milho**. 2000. 130 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.

DUKE, S.; UPADHYAY, P. D.; TRIPATHI, S. C. Antifungal, physicochemical, and insect-repelling activity of the essential oil of *Ocimum basilicum*. **Canadian Journal Botany**, Ottawa, v. 67, n. 7, p. 2085-2087, 1989.

EDDINS, A. H. Dry rot of corn caused by *Diplodia macrospora* Earle. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 20, p. 439-448, 1930.

EMPRESA DE ASSISTÊNCIA TÉCNICA E EXTENSÃO RURAL DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **Cultura do milho**. Disponível em: <<http://www.agricultura.mg.gov.br/info/2-01.asp?p=milho>>. Acesso em: 13 dez. 2009.

FARR, D. F.; BILLS, G. F.; CHAMURIS, G. P.; ROSSMAN, A. Y. **Fungi on plants and plants products in the United States**. Saint Paul: APS, 1989. 1252 p.

FLETT, B. C.; McLAREN, N. W.; WEHNER, F. C. Incidence of ear rot pathogens under alternating corn tillage practices. **Plant Disease**, Quebec, v. 82, n. 7, p. 781-784, July 1998.

FLETT, B. C.; WEHNER, F. C. Incidence of *Stenocarpella* and *Fusarium* cob rots in monoculture maize under different tillage systems. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 133, n. 4, p. 327-333, May 1991.

FREITAS, M. A.; CAMPOS, H. D.; MACHADO, J. C. Redução na produção de milho devido a podridão do colmo, causada por *Stenocarpella macrospora* e *S. maydis*. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUANDO DA UFLA, 12., 2003, Lavras. **Anais...** Lavras: UFLA, 2003. 1 CD-ROM.

HERNANDEZ, A. A. M.; ROSAS, R. M.; AGUILERA, P. M. M.; LAGUNES, T. A. Use of plant and mineral powders as an alternative for the control of fungi in stored maize grain. **Agrociência**, Pelotas, v. 32, n. 1, p. 75-79, 1998.

HOOKER, A. L.; WHITE, D. G. Prevalence of corn stalk rot in Illinois. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 60, p. 364-365, 1976.

JOHANN, H. *Diplodia macropora* on corn in Brasil. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 19, p. 9-10, 1935.

KELLERMAN, T. S.; PROZESKY, L.; SCHULTZ, R. A.; RABIE, C. J.; ARK, H. van; MAARTENS, B. P.; LUBBEN, A. Perinatal mortality a lambs of ewes exposed to cultures of *Diplodia maydis* (= *Stenocarpella maydis*) during gestation. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, Pretoria, v. 58, n. 4, p. 297-308, Dec. 1991.

KOCH, E.; EBRAHIN-NESBAT, F.; HOPPE, H. H. Light and electron microscopic studies on the development of soybean rust (*Phakopsora pachyrhizi* Syd.) in susceptible soybean leaves. **Phytopathologische Zeitschrift**, Berlin, v. 106, n. 4, p. 302-320, 1983.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, abr. 2006.

LOBATO, A. K. S.; SANTOS, D. G. C.; OLIVEIRA, F. C.; GOUVEA, D. D. S.; TORRES, G. I. O. S.; LIMA JÚNIOR, J. A.; OLIVEIRA NETO, C. A.; SILVA, M. H. L. Ação do óleo essencial de *Piper aduncum* L. utilizado como fungicida natural no tratamento de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. **Revista Brasileira de Biociências**, Pelotas, v. 5, n. 2, p. 915-917, 2007. Suplemento.

MACHADO, J. C. **Tratamento de sementes no controle de doenças**. Lavras: LAPS/UFLA/FAEPE, 2000. 138 p.

MACHADO, J. C.; CARVALHO, J. C. B.; VIEIRA, M. G. G. C.; GUIMARÃES, R. M. Methodology for infecting seeds by fungi using water restriction technique. In: INTERNATIONAL SEED TESTING CONGRESS SEED SYMPOSIUM, 26., 2001, Angers. **Proceedings...** Angers: ISTCS, 2001. p. 62.

MACHADO, J. C.; GUIMARÃES, R. M.; VIEIRA, M. G. G. C.; SOUZA, R. M.; POZZA, E. A. Use of water restriction technique in seed pathology. **Seed Testing International**, Vollebakk, n. 128, n. 1, p. 14-18, Mar. 2004.

MAGNANI, E. B. Z.; ALVES, E.; ARAÚJO, D. V. Eventos dos processos de pré-penetração, penetração e colonização de *Phakopsora pachyrhizi* em folíolos de soja. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 156-160, mar./abr. 2007.

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

McGEE, D. C. **Maize disease**: a reference source for seed technologist. Saint Paul: APS, 1988. 150 p.

MCLEAN, R. J.; BYTH, D. E. Inheritance of resistance to rust (*Phakopsora pachyrhizis*) in soybean. **Australian Journal of Agricultural Research**, Victoria, v. 31, n. 5, p. 951-956, 1980.

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

MEDINA, P. F.; RAZERA, F. L.; ROSSETO, C. J. Armazenamento de sementes tratadas com inseticidas e fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, Brasília, v. 17, n. 2, p. 236-242, 1995.

MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potential to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v. 87, n. 1, p. 126-130, Jan. 1995.

MORAIS, M. S. **Efeito de dois extratos vegetais sobre o desenvolvimento de *Fusarium oxysporum* e da incidência da murcha em feijão-vagem.** 2004. 48 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba, Areia.

MORELLO, C. L.; SANTOS, G. R.; MIRANDA, G. V.; ARAÚJO, E. Fungos associados à podridões em espigas de milho, ciclo normal, no estado do Tocantins. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 19, p. 272-273, 1994. Suplemento.

NAZARENO, N. R. X. Avaliação de perdas por podridões do colmo em milho (*Zea mays* L.) no estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 14, n. 2, p. 82-84, dez. 1989.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.).** 1991. 111 f. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

OWOLADE, O. F.; AMUSA, A. N.; OSIKANLU, Y. O. Q. Efficacy of certain indigenous plant extracts against seed-borne infection of *Fusarium moniliforme* on maize (*Zea mays* L.) in south western Nigeria. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 28, n. 7, p. 323-327, Nov. 2000.

PINTO, N. F. J. A. **Patologia de sementes de milho.** Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 1998. 44 p. (Circular Técnica, 29).

RABIE, C. J.; DUPREEZ, J. J.; HAYES, J. P. Toxicity of *Diplodia maydis* to broilers, ducklings and laying chicken hens. **Poultry Science**, Champaign, v. 66, n. 7, p. 1123-1128, July 1987.

REIS, A. C.; REIS, E. M.; CASA, R. T.; FORCELINI, C. A. Erradicação de fungos patogênicos associados à semente de milho e proteção de fungos do solo pelo tratamento com fungicida. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 20, n. 4, p. 585-591, out./dez. 1995.

REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 80 p.

SACCARDO, P. A. **Sylloge fungorum**. Michigan: E. Brothers, 1944. v. 3, pt. 7, 860 p.

SMITH, D. R.; WHITE, D. G. Disease of corn. In: SPRAGUE, G. F.; DUDLEY, Y. G. (Ed.). **Con and corn improvement**. Madison: Agronomy Monograph, 1988. p. 687-766.

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

SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. Kew: Commonwealth Mycological Institute, 1980. 696 p.

TEIXEIRA, H. **Variabilidade de *Acremonium strictum* e sua transmissibilidade e efeitos em sementes de milho (*Zea mays* L.)**. 2001. 114 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

TOMAZELA, L. T. **Adubação nitrogenada e de nutrientes na produtividade e incidência de doenças foliares em milho**. 2005. 57 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Corn and sorghum fungal disease laboratory**. Disponível em: <<http://www.ars.usda.gov/Research/docs.htm?docid=10482>>. Acesso em: 20 fev. 2006.

VIEGAS, E. C.; SOARES, A.; CARMO, M. G. F.; ROSSETTO, C. A. V.  
Toxicidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo  
*Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 915-919,  
out./dez. 2005.

WILCOXSON, R. D. Stalk rot in relation to yield of corn. **Phytopathology**,  
Saint Paul, v. 52, p. 416-418, 1962.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL-GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E.  
Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity  
against *Botrytis cinerea*. **Plant Disease**, Quebec, v. 81, n. 2, p. 204-210, Mar.  
1997.