



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

**CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES CAUSADAS POR FUNGOS NO
MILHO POR MEIO DA APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS**

Aluna: Janaina Costa e Silva

Orientador: Dr. Gil Rodrigues dos Santos

Palmas-TO
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES CAUSADAS POR FUNGOS NO MILHO POR MEIO DA APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Aluna: Janaina Costa e Silva

Orientador: Dr. Gil Rodrigues dos Santos

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Agroenergia da Universidade Federal do Tocantins, como parte dos requisitos para obtenção de título de mestre em Agroenergia/Cultivos Bioenergéticos.

Palmas-TO
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Tocantins

S586c Silva, Janaina Costa e .
Controle de doenças foliares causadas por fungos no milho por meio da aplicação de óleos essenciais. / Janaina Costa e Silva. – Palmas, TO, 2016.
51 f.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade Federal do Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas - Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2016.
Orientador: Gil Rodrigues dos Santos

1. Controle alternativo. 2. Fitopatógenos. 3. Zea mays. 4. Óleos essenciais. I. Título

CDD 333.7

TODOS OS DIREITOS RESERVADOS – A reprodução total ou parcial, de qualquer forma ou por qualquer meio deste documento é autorizado desde que citada a fonte. A violação dos direitos do autor (Lei nº 9.610/98) é crime estabelecido pelo artigo 184 do Código Penal.

Elaborado pelo sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



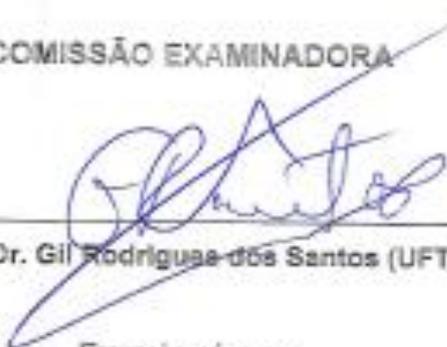
UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS
CAMPUS UNIVERSITARIO DE PALMAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROENERGIA

CONTROLE DE DOENÇAS FOLIARES CAUSADAS POR FUNGOS NO MILHO POR
MEIO DA APLICAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

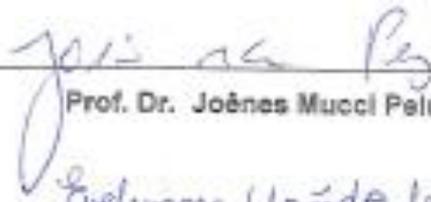
ALUNO: Janaina Costa e Silva

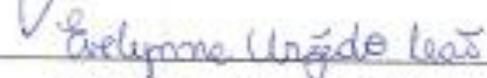
COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente:


Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos (UFT)

Examinadoras:


Prof. Dr. Joênes Mucci Pelúzio (UFT)


Prof. Dr. Evelynne Urzêdo Leão (UFT)

Data da Defesa: 30/06/2016

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGA para o formato da
Dissertação foram contempladas:


Prof. Dr. Gil Rodrigues dos Santos (UFT)
Orientador

DEDICATÓRIA

A minha amiga irmã Carolina Rocha Zanin da Costa (*in memoriam*), pela amizade por toda a vida, incentivo e apoio durante o curso. Com toda sua simplicidade fez muitas amizades e deixou muitas saudades.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai criador de todas as coisas, que em todos os momentos difíceis me deu força e me fez acreditar que tudo sou capaz de superar, e que a fé e a dedicação são as bases para as nossas conquistas.

Ao meu Professor Orientador Dr. Gil Rodrigues dos Santos, pelos ensinamentos, paciência, oportunidade e privilégio de ser sua orientada.

A minha grande amiga Fábiana, uma pessoa que Deus colocou na minha vida. Agradeço o incentivo para fazer o mestrado, por todo o apoio durante o curso e por acreditar que eu seria capaz.

A toda equipe técnica do Laboratório de Fitopatologia (UFT-Campus Gurupi), ao qual tive a oportunidade de realizar meus experimentos e aprender um pouquinho com cada um. Agradeço em especial Dalmácia, Ronice e Evelynne, que tiraram muito do seu tempo para meu auxílio. Obrigada também a todos pela amizade, são muitos especiais.

Aos meus colegas de mestrado em especial a Alessandra Lima que sempre se dispôs a ajudar no que fosse possível.

Agradeço aos meus pais, que sempre me apoiaram, incentivaram e se esforçaram para me dar o melhor. Sou fruto do esforço de vocês.

A toda a família e amigos que sempre acreditaram e torceram muito por mim.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia (*Campus Araguatins*) em geral: a direção, toda equipe de servidores, aos colegas biólogos pela amizade e colaboração com as aulas, aos colegas agrônomos pelos ensinamentos agronômicos e a minha Coordenadora Katia Paulino que sempre contribuiu para que eu conseguisse realizar meus estudos da melhor forma possível.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
REFERÊNCIAS	5
CAPÍTULO I	7
Eficácia de óleos fixos e essenciais no controle <i>in vitro</i> de fungos fitopatogênicos do milho (<i>Zea mays</i>).....	8
Resumo	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2.MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1 Efeitos de óleos fixos e essenciais no controle de fitopatógenos e na germinação de sementes de milho.....	11
2.2 Patogenicidade da micoflora associada as sementes de milho	12
2.2.1 Obtenção e cultivo dos isolados.....	12
2.2.2 Teste de patogenicidade	12
2.3 Fitotoxicidade do óleo essencial de noni às plântulas de milho	12
2.4 Efeito do tratamento de sementes de milho com doses crescentes de óleo essencial de noni sobre o controle de fitopatógenos e germinação	13
2.5 Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium sp.</i> , <i>Exserohilum sp.</i> e <i>Curvularia sp.</i> utilizando diferentes concentrações do óleo de noni	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
3.1 Efeitos de óleos fixos e essenciais no controle de fitopatógenos e germinação de sementes de milho.....	15
3.2 Patogenicidade da micoflora associada às sementes de milho	18
3.3 Fitotoxicidade do óleo essencial de noni às plântulas de milho	19
3.4 Controle de fitopatógenos e germinação de sementes de milho utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de noni	19
3.5 Inibição do crescimento micelial de <i>Fusarium sp.</i> , <i>Exserohilum sp.</i> e <i>Curvularia sp.</i> utilizando diferentes concentrações do óleo de noni	21
4 CONCLUSÕES.....	21
REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II	29

Eficiência do óleo essencial de noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) no controle da mancha foliar causada por <i>Exserohilum turcicum</i> na cultura do milho.....	30
Resumo	30
Abstract: Efficiency of essential oil of noni (<i>Morinda citrifolia</i> L.) in control of corn leaf spot caused by <i>Exserohilum turcicum</i>	31
1 INTRODUÇÃO.....	32
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
2.1 Sanidade de sementes de milho.....	34
2.2 Transmissibilidade semente-plântula de <i>Exserohilum turcicum</i>	34
2.3 Patogenicidade de <i>Exserohilum turcicum</i> às plântulas de milho	35
2.4 Análise cromatográfica do óleo essencial de noni	35
2.5 Fitotoxicidez em plântulas de milho utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de noni	36
2.6 Germinação de conídios de <i>Exserohilum turcicum</i> em função de diferentes concentrações do óleo essencial de noni	36
2.7 Controle (preventivo e curativo) da mancha de <i>Exserohilum turcicum</i> em função de diferentes concentrações de óleo essencial de noni	37
3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
3.1 Sanidade de sementes de milho.....	39
3.2 Transmissibilidade semente-plântula de <i>Exserohilum turcicum</i>	40
3.3 Patogenicidade de <i>Exserohilum turcicum</i> às plântulas de milho	41
3.4 Análise cromatográfica do óleo essencial de noni	42
3.5 Fitotoxicidez em plântulas de milho utilizando diferentes concentrações	42
de óleo essencial de noni	43
3.6 Efeito do óleo essencial de noni na germinação de conídios de <i>Exserohilum turcicum</i>	44
3.7 Controle (preventivo e curativo) da mancha de <i>Exserohilum</i> em função de diferentes concentrações de óleo essencial de noni	46
REFERÊNCIAS	48

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 01: Lesões necróticas de cor marrom causados por *Exserohilum* sp. (A), podridão do caule causada por *Fusarium* sp. (B) e pequenas lesões elípticas causadas por *Curvularia* sp. (C) representando os sintomas detectados em teste de patogenicidade ...27

Figura 02: Incidência de fungos presentes em sementes de milho tratadas com diferentes concentrações de óleo de noni (*Morinda citrifolia* L.).....277

Figura 03: Inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp.(A), *Curvularia* sp. (B) e *Exserohilum* sp. (C) utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.)**Erro! Indicador não definido.**8

CAPÍTULO II

Figura 01: Sanidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) obtidas da feira comercial do município de Gurupi-TO no ano de 2015.....40

Figura 02: Germinação de conídios de *Exserohilum turcicum* em função de concentrações crescentes de óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.).....45

Figura 03: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o controle (preventivo e curativo) de *Exserohilum turcicum* em função de diferentes concentrações de óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.). Gurupi-TO, 201647

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 01: Médias estatísticas da incidência de fungos presentes em sementes de milho (*Zea mays*) e germinação das sementes tratadas com concentração de 5,0% e 20,0% de óleos fixos e essenciais. Gurupi -TO, 2015266

Tabela 02: Fitotoxidez em plântulas de milho em função da aplicação de doses crescentes de óleo essencial de noni. Gurupi-TO, 2015.....277

CAPÍTULO II:

Tabela 01. Porcentagem relativa (Área %), obtida por Cromatografia à Gás acoplada a Detector de Espectrometria de Massas, dos constituintes do óleo essencial de frutos maduros de noni (*Morinda citrifolia* L.).....422

Tabela 02: Fitotoxidez em plântulas de milho em função da aplicação de diferentes concentrações de óleo essencial de noni. Gurupi-TO, 2015444

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos o consumo de energia aumentou significativamente e conseqüentemente a oferta da mesma. Grande parte da energia produzida no mundo é derivada de combustíveis fósseis, grande poluidor e emissor de gases de efeito estufa. Os interesses pela produção de biocombustíveis a partir de recursos renováveis são vários, dentre eles a diminuição da alta concentração de gases derivados do petróleo e a grande dependência do mercado externo para importação deste produto (URQUIAGA et al., 2005).

Cerca de 40% da matriz energética brasileira é derivada de fontes renováveis, principalmente de fontes como a biomassa e as hidrelétricas. Esse fato é uma vantagem significativa para o país quando comparada a matriz energética mundial que possui média de 13,8%. Desse total de renováveis a maior porcentagem é derivada da produção de etanol e bagaço pela cana-de-açúcar (MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA, 2015).

É grande a expectativa mundial para produção de biocombustíveis a partir de biomassa. Os Estados Unidos e a Europa produzem grande parte do seu biocombustível a partir de culturas energéticas, mas há grandes investimentos para obtenção utilizando material celulósico já que as culturas utilizadas como fonte energética competem com as culturas de alimento nesses países (STEPHANIE e CHRISTOPHE, 2014).

O Brasil, por ser um país de clima tropical e subtropical, tem grande potencial para a produção de amiláceas e oleaginosas, culturas utilizadas para a produção de etanol e biodiesel respectivamente. Paz et al., (2000) ressalta a dimensão do território brasileiro com sua grande variedade de terras agriculturáveis, os diferentes tipos de clima e solo, além de um potencial hídrico elevado que em conjunto favorecem a produtividade de vários tipos de culturas.

Os Estados Unidos é o maior produtor mundial de etanol e obtém o biocombustível a partir da cultura do milho, e, há alguns anos, intercala com o Brasil a posição de maior exportador do biocombustível. O Brasil utiliza para a produção desse biocombustível a cana-de-açúcar. No ano de 2014 os Estados Unidos lideraram o mercado de exportação em um momento que os brasileiros padeceram de uma crise severa da seca fazendo diminuir a venda em mais de 50% para o mercado externo. No ano de 2015, o Brasil novamente recupera a liderança. Nesse contexto, o etanol, em virtude da crescente

valorização do dólar nos Estados Unidos se tornou mais caro no mercado internacional (PARKER, 2015). Partindo desses pressupostos, Cabello (2006) destaca que apesar de o milho consumir muita energia para os processos de hidrólises, unidades processadoras do grão operam durante os 12 meses do ano podendo diversificar com outros materiais na lavoura e permitindo, dessa forma, a geração de diversos produtos além do etanol, farinhas, amidos, óleos e outros.

No Estado do Mato Grosso existem três usinas (USIMAT, LIBRA E PORTO SEGURO) de cana de açúcar que produzem etanol de milho durante a entre safra. No período da última safra, as três usinas juntas produziram 114 milhões de litros de etanol de milho. Já existe prospecção de novas usinas *flex* estarem em funcionamento no estado em 2017 (ONDEI, 2016).

As várias formas de utilização do milho faz com que o mesmo cresça no que se refere aos seus aspectos econômicos. O maior consumo deste cereal se deve a alimentação animal que constitui cerca de 70% no mercado mundial. Além do consumo humano e animal, o milho é comercializado para indústrias de alta tecnologia (GANEM, 2013).

Com toda prospecção para o agronegócio, o milho é uma das culturas mais cultivadas pela agricultura familiar, tanto para o próprio consumo como para vendas em comércio local. A soja com maior vantagem no mercado internacional devido as suas características de *commodity*, enquanto a milho prioriza o abastecimento do mercado interno.(SALLA, 2010). Segundo a CONAB (2016) a área brasileira de produção de milho deverá atingir no ano corrente 15.746,5 mil hectares, representando um aumento de 0,3% em relação ao ano passado, isso reunindo a primeira e segunda safra.

A produção do milho nos Estados Unidos é mais que o dobro do que é produzido no Brasil. Enquanto nos Estados Unidos o rendimento médio da cultura é de 8.0000 kg ha⁻¹ no Brasil esse rendimento chega a 3.900 kg ha⁻¹. Um dos fatores que determinam esse baixo rendimento é a falta de investimento em alta tecnologia, bem como a falta de assistência técnica e alterações climáticas (CONAB, 2014). Outro fator que interfere na produtividade do milho é o fato dessa cultura ser susceptível ao ataque de vários tipos de patógenos, como bactérias, fungos, vírus, protozoários e nematoides. Nerbass et al., (2008) afirmam que por serem responsáveis por causar problemas de germinação, podridões na base do colmo e nas raízes, além de causar emergência em plântulas, os fungos são os principais microrganismos transmitidos via sementes.

Os pesticidas, ao longo de muitas décadas, constituem o meio mais utilizado para o

controle de doenças. Além de trazer consequências graves ao meio ambiente, leva ao desenvolvimento de organismos resistentes (SOYLU et al., 2010). Esses produtos químicos assumem papel de destaque na contaminação de água superficial e subterrâneo no Brasil devido a sua grande utilização nas lavouras pelos agricultores (FERNANDES NETO e SARCINELLI, 2009).

Sousa et al., (2012) ressaltam que como estratégia para o futuro pode-se destacar a descoberta de métodos que fazem com que a planta se auto proteja contra patógenos, ativando assim seu mecanismo de defesa ao invés da utilização de defensivos agrícolas que poderiam trazer malefícios aos consumidores e ao meio ambiente.

No entanto, pesquisadores buscam plantas, como as medicinais, por se configurarem novas fontes promissoras para atuarem no controle de patógenos em plantas e sementes. Os óleos essenciais, extraídos de vegetais, surgem como um destes agentes de estudos no controle de fungos patogênicos, onde se busca um método de controle mais barato que seja menos agressivo às culturas, ao ambiente e a saúde humana. Pesquisas são realizadas em sistema *in vitro* e *in vivo* verificando a resposta do crescimento dos fungos na presença do óleo. Assim, o método de controle utilizando óleos essenciais se tornará uma forma rentável para o pequeno e médio agricultor que deseja comercializar um defensivo economicamente mais barato e sem a presença de agentes químicos, potencialmente maléficos ao meio ambiente.

Os óleos fixos são misturas de substâncias lipídicas, geralmente proveniente de sementes, pouco estáveis na presença de luz, calor e ar, além de pouco solúveis em água e sendo substâncias não voláteis. Ainda são incipientes os estudos em relação a esses óleos. Os óleos essenciais são misturas de substâncias de baixo peso molecular, voláteis e lipofílicas, além de na maioria das vezes serem constituídos de moléculas de natureza terpênica (BETTIOL e MORANDI, 2009), e emitem assim uma comunicação química com as plantas, fazendo com que as mesmas se protejam de agentes causadores de moléstias fúngicas (SAITO e SCRAMIN, 2000). Segundo Stadnik e Talamini (2004), os metabólitos dos vegetais podem agir de três diferentes formas: como ação antimicrobiana, agindo diretamente sobre o patógeno; estimulando o mecanismo de defesa da planta ou como bioestimulante provocando o crescimento da planta.

Os óleos essenciais possuem metabólitos secundários que não são substâncias efetivamente essenciais à vida do vegetal, mas são substâncias que conferem maior e melhor sobrevivência ao mesmo (SANTOS,1999). Os fatores genéticos dos vegetais são responsáveis por nortear a síntese de metabólitos secundários nos vegetais. A reação

dessa carga genética é influenciada por fatores bióticos (microrganismos, insetos e plantas) e fatores abióticos (temperatura, umidade, luz e estresse hídrico) que podem levar situações de estresse ao vegetal fazendo-o assim, produzir essas substâncias de defesa (BETTIOL e MORANDI, 2009).

As plantas, principalmente as não domesticadas, ao produzir seus metabólitos secundários conseguem sobreviver na natureza devido à ação de sintetizar sua própria fonte de defesa contra o ataque de patógenos. Isso mostra que o uso desses compostos como controle alternativo utilizados na agricultura pode ser de grande importância para o cultivo de espécies, como o milho, que é vulnerável a vários tipos de doenças e que com o controle maior destas, poderá ter maior produtividade para o setor econômico, inclusive ao de biocombustível. Nessa perspectiva o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito de óleos fixos e essenciais no controle de doenças causadas por fungos em sementes e plantas de milho.

REFERÊNCIAS

BETTIOL, W.; MORANDI, A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 334p, 2009.

CABELLO, C. **Produtos derivados de fécula de mandioca - etanol**. In: WORKSHOP SOBRE TECNOLOGIAS EM AGROINDÚSTRIAS DE TUBEROSAS TROPICAIS, 4, Botucatu, SP. Anais... Botucatu: UNESP, p.02-06, 2006..

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, V.1-SAFRA 2013/14, n.12 - Décimo Segundo Levantamento, Brasília, p. 1-127, set.2014.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO: **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos**, V.3-SAFRA 2015/16, n.09 – Nono levantamento, Brasília, p. 1-174, jun.2016.

FERNANDES NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Revista Engenharia Sanitária e Ambiental**, v.14, n.1, p.69-79, 2009.

GANEM, E.L.O. **Caracterização dos sistemas de produção de milho no município de Vitória da Conquista- BA: Estudo de Caso**.104F. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Vitória da Conquista – BA, 2013.

Lo, C. L; WEIERGANG, I. BONHAM, C.; HIPSKIND, J.; WOOD, K.; NICHOLSON, R. L. Phytoalexin accumulation in sorghum: identification of methyl ether of luteolinidin. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 49: 21-31. 1996.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA. **Resenha Energética Brasileira**- Ed. Junho 2015. 32p. Disponível em <<http://www.mme.gov.br/documents/1138787/1732840/Resenha+Energ%C3%A9tica+-+Brasil+2015.pdf/4e6b9a34-6b2e-48fa-9ef8-dc7008470bf2>> Último acesso em 30 de maio de 2016.

NERBASS, F. R.; CASA, R. T.; ANGELO, H. R. Sanidade de Sementes de milho comercializadas na safra agrícola de 2006/2007 em Santa Catarina e no Rio Grande do Sul. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 7, p. 30-36, 2008.

ONDEI, V. Etanol de milho: o novo combustível do Mato Grosso. **Nova cana.com**, 12 de abril de 2016. <https://www.novacana.com/n/etanol/mercado/etanol-milho-novo-combustivel-mato-grosso-120416/> Último acesso em 07 de junho de 2016.

PARKER, M. Dólar forte pode fazer Brasil ser novamente o maior exportador de etanol do mundo. **Nova Cana.com**, 15 de abril de 2015. Disponível em: <http://www.novacana.com/n/etanol/mercado/exportacao/dolar-forte-brasil-maior-exportador-etanol-mundo-150415/>. Último acesso em 20 de outubro de 2015.

- PAZ, V. P S.; TEODORO, R. E. F.; MENDONÇA, F. C. Hídricos Recursos, agricultura irrigada e Meio Ambiente. **Rev. bras. eng. Agríc. ambiente**, vol.4, n.3 [cited 2016/07/20], pp.465-473, 2000.
- SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. Plantas aromáticas e seu uso **na agricultura**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 48p, 2009. (EMBRAPA Meio Ambiente. Documentos, 20).
- SALLA, D. A; FURLANETO, F. P. B; CABELLO, C; KANTHACK, R. A. Estudo energético da produção de biocombustível a partir do milho. **Ciência Rural**, vol.40, n.9, p.2017-2022, 2010.
- SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacologia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre. Ed. da UFRGS; Florianópolis, Ed. da UFSC. p. 323-354, 1999.
- SOUSA, R, M S; SERRA, I, M, S; MELO, T; A, M. Efeito de óleos essenciais como alternativa no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, em pimenta. **Summa Phytopathol**, v. 38, n. 1, p. 42-47, 2012.
- SOYLU, E. M.; KURT, S.; SOYLU, S. *In vitro* e *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agente *Botrytis cinérea*. **International Journal of Food Microbiology**, 143, n.3, p. 183-189, 2010.
- STADNIK, M.J.; TALAMINI, V. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: _____. **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis:CCA/UFSC, 2004. p.45-62.
- STEPHANIE, Y. S; CHRISTOPHER, J. M. Will energy crop yields meet expectations? **Biomass and Bioenergy**, 65 (2014) 3 e 12.
- URQUIAGA,S; ALVES, B, J, R e BOODEY, R.M. Produção de biocombustíveis: A questão do balanço energético. **Política Agrícola**. Ano XIV , n. 1, p. 42-46, Jan./Fev./Mar. 2005.

CAPÍTULO I

EFICÁCIA DE ÓLEOS FIXOS E ESSENCIAIS NO CONTROLE *IN VITRO* DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS DO MILHO (*Zea mays*)

Eficácia de óleos fixos e essenciais no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos do milho (*Zea mays*)

Janaina Costa e Silva¹, Dalmarcia de Sousa Carlos², Ronice Alves Veloso², Evelynne Urzêdo Leão³, Fabia Silva de Oliveira Lima⁴, Gil Rodrigues dos Santos^{5*}

¹Mestranda em Agroenergia pela Universidade Federal do Tocantins. ²Mestre em Produção Vegetal pela Universidade Federal do Tocantins. ³Doutora em Agronomia (Proteção de plantas) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. ⁴Doutora em Agronomia (Produção vegetal) pela Universidade Federal de Goiás. ⁵Doutor em Fitopatologia pela Universidade de Brasília. *Autor para correspondência. E-mail: gilrsan@uft.edu.br.

Resumo

Objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia de óleos fixos e essenciais, em diferentes concentrações, no controle de fungos fitopatogênicos do milho. As sementes foram tratadas com concentrações de 5% e 20% de seis tipos de óleos fixos (andiroba, buriti, macaúba, mamona, copaíba e neem) e três tipos de óleos essenciais (capim-limão, citronela e noni), submetidas ao método do papel filtro (Blotter test) e colocadas em câmara de incubação com fotoperíodo de 12h. Foi realizada a verificação da patogenicidade através da inoculação de fungos em plântulas de milho. Para o teste de fitotoxidez utilizou-se diferentes concentrações de óleo de noni aplicadas em plântulas de milho. O crescimento micelial foi avaliado em intervalos de 48h durante dez dias após serem aplicados diferentes concentrações de óleo de noni. Constatou-se a patogenicidade nas plântulas de milho para os fungos: *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e *Exserohilum* sp. O óleo essencial de noni foi o mais promissor entre os demais utilizados, sendo eficiente no controle de fitopatógenos. O óleo de noni foi fitotóxico às plântulas em concentrações maiores que 1%. Este óleo aplicado nas sementes inibiu significativamente

a germinação a partir da concentração de 1,25%. O crescimento micelial diminui à medida que se aumentou as concentrações de óleo de noni.

Termos para indexação: Controle alternativo. Fitopatógeno. Sanidade de sementes. *Zea mays*.

1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o milho é um cereal que apresenta alto potencial de produção, mas o seu rendimento no país ainda é baixo levando em consideração o potencial e a importância que a cultura apresenta, sendo fundamental um aperfeiçoamento dos sistemas de produção (CRUZ et.al., 2010).

A infecção de fungos em sementes é um dos principais fatores que leva à baixa produtividade de várias culturas, em virtude da ocorrência de podridões radiculares, caulinares e nas sementes, além de causarem também a morte de plântulas em pré e pós-emergência. As sementes constituem-se o meio mais eficiente de abrigo, transporte e disseminação dos patógenos e estão diretamente envolvidas no ciclo de vida desses agentes causadores de doenças (SILVA et al., 2014).

Produtos alternativos como os óleos essenciais têm sido bastante estudados para o controle de patógenos em plantas, e tem se mostrado bastante eficazes (CAMATTI-SARTORI et al., 2011).

Os óleos essenciais têm apresentado em pesquisas grande potencialidade no controle de fitopatógenos, procurando assim diminuir a incidência desses microrganismos patogênicos que causam prejuízos, tanto na agricultura quanto na indústria alimentícia (BAKKALI et al., 2008), e atuam no controle de patógenos causadores de doenças em plantas devido suas propriedades fungitóxicas (SEIXAS et al., 2011).

Pesquisas sobre a eficiência dos óleos fixos como controle alternativo são incipientes. BETTIOL e MORANDI (2009) destacam que os óleos fixos são misturas de

substâncias lipídicas, geralmente proveniente de sementes, pouco estáveis na presença de luz, calor e ar, além de pouco solúveis em água e os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias lipofílicas, com baixo peso molecular, proveniente de plantas aromáticas, condimentares e medicinais. Muito presente nas folhas e frutos desses vegetais, os óleos essenciais possuem como principal característica a volatilidade, diferenciando-se assim dos óleos fixos que não são voláteis.

Os estudos visando a redução da incidência de patógenos por meio de métodos alternativos em substituição aos produtos químicos se tornam de grande importância para os pequenos e médios produtores de milho, pois o uso de óleos essenciais além de ser um método mais barato é também importante na preservação da saúde dos consumidores que deixam de utilizar alimentos contaminados por produtos tóxicos (COITINHO et al., 2010). Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficácia de óleos fixos e essenciais no controle *in vitro* de fungos fitopatogênicos associados às plantas de milho.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Tocantins-Campus Universitário de Gurupi, utilizando-se sementes de milho tipo crioulo para os ensaios com aplicação de diferentes concentrações de óleos essenciais diretamente sobre as sementes. Estas foram obtidas na feira comercial de lotes de cinco agricultores do município de Gurupi-TO, no ano de 2015. Antes da realização dos ensaios as sementes foram misturadas e em seguida selecionadas. Foram utilizadas também sementes de milho (híbrido 30F53YH) tratadas com fungicida para os testes de patogenicidade e fitotoxicidade. Os óleos essenciais utilizados - capim-limão (*Cymbopogon citratus*); citronela (*Cymbopogon nardus* L.); noni (*Morinda citrifolia* L.) - foram obtidos a partir de plantas coletadas no município de Gurupi, Estado do Tocantins

e, em seguida, foram extraídos pelo método de hidrodestilação. Os óleos fixos de buriti (*Mauritia flexuosa*), macaúba (*Acrocomia aculeata*), andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.), mamona (*Ricinus communis* L.), copaíba (*Copaifera langsdorfii*), neem (*Azadirachta indica* A. Juss) foram obtidos em feira comercial da cidade de Araguatins, Estado do TO.

2.1 Efeitos de óleos fixos e essenciais no controle de fitopatógenos e na germinação de sementes de milho

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial $9 \times 2 + 1$, sendo constituído por óleos x concentrações + testemunha (sementes não tratadas). Foi avaliado o efeito dos seis tipos óleos fixos e dos três tipos de óleos essenciais em duas concentrações (5% e 20%) e quatro repetições.

No ensaio utilizou-se o método do papel filtro (Blotter test). As caixas de *gerbox* foram previamente esterilizadas com solução de hipoclorito a 1% e forradas com duas folhas de papel filtro esterilizado e umedecido com água destilada. . As sementes foram tratadas em 5 mL da solução de óleo, sendo este dissolvido em água com Tween 80 (1%). Foram utilizadas oito caixas *gerbox* por tratamento, sendo que cada unidade recebeu 25 sementes. Cada repetição foi considerada 50 sementes (duas caixas *gerbox*) totalizando 200 sementes por tratamento. Após serem colocadas no *gerbox* foram acondicionadas em câmara de incubação sobre temperatura de 25°C durante sete dias e expostas sob alternância de luz 12 horas claro/12 horas escuro.

Após o período de acondicionamento, as sementes foram analisadas quanto a incidência fúngica e a germinação. As análises foram realizadas utilizando-se microscópio estereoscópio e, sempre que necessário, o microscópio óptico, além da consulta para identificação dos fungos em manual especializado de BARNETT & HUNTER (2010).

As médias obtidas em porcentagem foram transformadas em arco seno $\sqrt{x/100}$ e submetidas à análise de variância (ANOVA) com aplicação do teste de Scott-Knott ao

nível de 5% de significância por intermédio do programa ASSISTAT 7.7.

2.2 Patogenicidade da micoflora associada as sementes de milho

2.2.1 Obtenção e cultivo dos isolados

Os isolados de *Fusarium* sp., *Exserohilum* sp. e *Curvularia* sp. foram obtidos nas sementes de milho incubadas, descrito no ensaio anterior. Após sete dias foi retirada parte do micélio de cada fungo e colocado em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar). As placas de Petri (90 mm), com o isolado, ficaram acondicionadas em câmara de incubação por 15 dias até o crescimento micelial atingir a borda da placa, com temperatura média de 25°C e fotoperíodo de 12h de luz.

2.2.2 Teste de patogenicidade

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições. Após o desenvolvimento das colônias fungicas, adicionou-se 10 mL de água destilada esterilizada, em cada placa. Posteriormente, com auxílio de um pincel de cerdas macias foi realizado o desprendimento do micélio, a solução foi filtrada em gaze e os conídios foram quantificados em câmara de Neubauer onde os valores encontrados foram ajustados para a concentração de 10^6 . As suspensões foram aplicadas, com um borrifador manual, em plântulas de milho com trinta dias após o plantio. Após a aplicação, os vasos foram mantidos em câmara úmida e escura por um período de 48h e, após esse período, as plântulas foram mantidas em condição ambiente por sete dias.

Fragmentos com partes das lesões encontradas foram desinfestados no álcool (50%) durante 30s, hipoclorito (1%) durante 40s, lavado em três recipientes com água destilada/esterilizada e, em seguida, colocado em meio de cultura BDA. As placas foram vedadas com papel filme, identificadas e depois levadas à câmara de incubação por um período de sete dias, visando assim, cumprir os postulados de Koch.

2.3 Fitotoxicidade do óleo essencial de noni às plântulas de milho

Sementes de milho foram semeadas em vasos de polietileno constituído de quatro repetições. A solução do óleo a ser aplicada foi de 10 mL, sendo o mesmo dissolvido em água com Tween (80). O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco tratamentos (concentrações de 1; 2; 3; 4 e 5%) e três repetições. Após 30 dias da semeadura a solução foi aplicada nas folhas das plântulas de milho com auxílio de um borrifador, e a análise do efeito fitotóxico do óleo no milho foi realizada 48h após a sua aplicação.

Para a avaliação da fitotoxicidade utilizou-se a escala adaptada de Dequech et al. (2008), Freitas et al. (2009) e Cogliatti et al. (2011): 0= para ausência de fitotoxicidade; 1-25= leve clorose ou início de necrose nas folhas das plântulas; 26- 50= clorose ou necrose média nas folhas das plântulas; 51-75=alta clorose ou alta necrose nas folhas das plântulas; 76 -100= murcha e ressecamento da planta.

Devido os altos índices de fitotoxidez proporcionados pelas concentrações de 1% a 5%, realizou-se novo teste, da mesma forma como descrita para o anterior, só que com concentrações menores na ordem de 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 e 1,5%.

2.4 Efeito do tratamento de sementes de milho com doses crescentes de óleo essencial de noni sobre o controle de fitopatógenos e germinação

O ensaio foi realizado utilizando-se o delineamento inteiramente casualizado com sete tratamentos (concentrações de óleo essencial de noni: 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25 e 1,5%) e quatro repetições.

Sementes do milho crioulo foram incubadas pelo método do papel-filtro (Blotter test) e utilizou-se por amostra, oito caixas *gerbox* onde foram distribuídas 200 sementes após estas serem tratadas em 5 mL das referidas concentrações do óleo essencial de noni. O óleo foi dissolvido em água com Tween 80 (1%). Cada unidade experimental recebeu 25

sementes e para a avaliação estatística foram consideradas duas unidades (50 sementes) como uma repetição. As caixas foram previamente esterilizadas com solução de hipoclorito a 1%, forradas com duas folhas de papel filtro esterilizadas e umedecidas com água destilada, e após receberem as sementes foram acondicionadas em câmara de incubação com temperatura de 25°C, durante sete dias sob alternância de luz 12/12 h.

Passado o referido período de acondicionamento, as sementes foram analisadas quanto à incidência fúngica, após a aplicação dos tratamentos, e a germinação utilizando-se microscópio estereoscópico, e quando necessário o microscópio óptico, além da consulta para identificação em manual especializado (BARNETT & HUNTER, 2010). Os dados em porcentagem foram submetidos à regressão de função quadrática e foi calculado o coeficiente de determinação utilizando-se o programa SigmaPlot 10.0.

2.5 Inibição do crescimento micelial de *Fusarium sp.*, *Exserohilum sp.* e *Curvularia sp.* utilizando diferentes concentrações do óleo de noni

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado onde foram empregados oito tratamentos com três repetições. Os tratamentos foram as concentrações do óleo essencial de noni na ordem de 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 e 1,5%.

Em câmara de fluxo foi feita uma aplicação de 100µL ou 0,1mL de cada concentração do óleo em placas de Petri contendo meio BDA. Com auxílio de uma alça de Drigalsky a solução foi espalhada em cada placa e, em seguida, discos de micélio de 6 mm dos isolados de *Fusarium sp.*, *Exserohilum sp.* e *Curvularia sp.* foram transferidos para o centro de cada placa. As placas foram vedadas com papel pvc e identificadas com eixos Norte-Sul para facilitar a medição e obtenção da média do crescimento radial do micélio. Em seguida, foram acondicionadas em câmara de incubação com fotoperíodo de 12/12h e a 25°C durante 10 dias.

Com o auxílio de um paquímetro o crescimento do micélio foi avaliado durante dez

dias em intervalos de 48h, obtendo-se a média dos dois eixos ortogonais das placas. No programa computacional SigmaPlot 10.0 os dados foram submetidos à regressão linear que foi a equação que melhor se ajustou, calculando-se o coeficiente de determinação.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Efeitos de óleos fixos e essenciais no controle de fitopatógenos e germinação de sementes de milho

Houve diferença significativa entre os fatores para a germinação e para a incidência dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. Para os fungos *Rhizopus* sp, *Exserohilum* sp e *Curvularia* sp. não houve diferença significativa entre os fatores e também em relação a testemunha. A maioria dos óleos essenciais, apresentaram diferenças significativas em relação aos óleos fixos e a testemunha (Tabela 01). A análise das sementes de milho revelaram a presença dos fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Exserohilum* e *Curvularia*. Os três últimos apresentaram-se patogênicos às plantas de milho no teste de patogenicidade. Os três primeiros são considerados na maioria das vezes como fungos contaminantes ou fungos de armazenamento, podendo causar danos às sementes mesmo antes de serem semeadas.

Todas as sementes tratadas com óleos fixos a concentração de 5% apresentaram além de grande incidência dos contaminantes *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp., também ocorrência de *Fusarium* sp. que foi o gênero fitopatogênico encontrado em maior quantidade em todas as análises. O óleo de neem e de noni foram os dois que apresentaram melhor controle para esse fungo a essa concentração. Em 1% das sementes tratadas com óleo de copaíba apresentaram incidência da espécie *Curvularia* sp. e a mesma quantidade, tratadas com óleo de buriti, apresentaram a espécie *Exserohilum* sp. No óleo de andiroba, as sementes também mostraram a presença do

gênero *Exserohilum* em 0,5% do total de sementes analisadas, comprovando-se assim que esses óleos, à concentração de 5%, foram ineficazes no controle desses fitopatógenos. Na literatura há poucas informações sobre a ação de óleos fixos no controle de fungos em sementes e plântulas de milho.

As sementes tratadas com o óleo essencial de citronela e capim-limão nas concentrações de 5% não controlaram a incidência de *Fusarium* sp. De acordo com Guimarães et al. (2011) e Combrinck et al. (2011), o óleo essencial de capim-limão possui compostos com comprovada ação fungitóxica por possuir substâncias como o citral e o limoneno. Ao investigar a ação do óleo de citronela no cafeeiro constatou-se uma eficácia sobre o controle dos fungos *Hemileia vastatrix* e *Cercospora coffeicola* com respectivamente 47,2% e 29,7% de eficiência. Assim, além de controlar a ferrugem e cercosporiose, doenças causadas por fungos, o óleo promoveu um aumento de quitinase e peroxidase nas mudas da cultura.

O óleo essencial de noni obteve um melhor efeito na inibição para todos os tipos de fungos. As sementes tratadas com esse óleo, a 5%, apresentaram 2,5% para *Aspergillus* sp. e 2,0% para *Fusarium* sp., não encontrando mais nenhum outro tipo de fungo nas sementes com esse tratamento.

Os gêneros *Exserohilum* e *Curvularia* apareceram em algumas sementes tratadas com óleos fixos a 5% e a 20%, assim, esses óleos demonstram ineficiência para o controle desses fitopatógenos. E nesta maior concentração, esses óleos, também apresentaram incidência de *Fusarium* sp. e diferiram da testemunha.

Os óleos essenciais de citronela e noni, na concentração de 20% não apresentaram nenhum tipo de fungo. Brito et al. (2010) obtiveram por meio de ensaios, respostas positivas para sementes de milho tratadas com óleo essencial de citronela em concentrações de 5, 10 e 15%, e afirma que as mesmas apresentaram baixa infestação

para *Aspergillus* sp., com destaque para a dose de 15%, e as doses de 10 e 15% reduziram drasticamente a 0% a incidência dos fungos *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp. Pereira et al. (2011) observou por meio de ensaios em plantas de café que o óleo essencial de capim citronela reduziu a incidência e a severidade da cercosporiose. Para a mesma concentração de 20%, no tratamento com óleo essencial de capim-limão, foram identificados *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp. em 0,5% das sementes. Porém, esses três óleos essenciais a essa mesma concentração não apresentaram diferença significativa entre si, para o efeito da inibição de todos os fungos, mas apresentaram diferença significativa em relação a todos os outros tipos de óleos.

Sobre a germinação das sementes, houve diferença entre os fatores e a testemunha. Para os tratamentos com os óleos de andiroba, copaíba, neem e capim limão à 5%, não houve diferença significativa. Dos óleos fixos, o que apresentou menor valor foi o de macaúba com 74.5% de germinação. A germinação das sementes, tratadas com óleo de citronela e noni apresentaram o menor valor entre todos, 59,5% e 57,5% respectivamente, apresentando diferença significativa em relação a todos os outros óleos.

As Regras para Análise de Sementes (BRASIL, 1992- adapt. BRASIL, 2009) exigem padrões oficiais superiores a 80% de germinação para que as sementes se tornem viáveis para a comercialização. Dos tratamentos com os óleos essenciais o único que apresentou germinação viável, segundo os padrões da RAS, foi o de capim-limão, embora este não tenha sido eficiente na redução do *Fusarium* sp. a concentração de 5%.

Para todos os óleos fixos a concentração de 20% a germinação atendeu o mínimo de 80% estabelecidos pela RAS. Os óleos essenciais na concentração de 20% apresentaram valores muito baixos para a germinação da semente. Souza Filho et al. (2009), verificaram em seus estudos o efeito alelopático sobre a germinação das sementes, utilizando diferentes tipos de óleos essenciais, e ressaltam que o efeito dessa

alelopatia variou em função da concentração. O tratamento com o óleo de citronela, além de inibir o aparecimento de qualquer tipo de fungo nas sementes, teve apenas 11,5% de germinação, e o de capim-limão teve 7% de suas sementes germinadas. O óleo essencial de noni inibiu em 100% a germinação das sementes, assim como o surgimento de qualquer microrganismo. Constatou-se então que, em maior concentração, o efeito dos óleos essenciais causou maior inibição, tanto do crescimento dos fungos quanto na germinação das sementes. As concentrações de 20% para os três tipos de óleos essenciais utilizados neste trabalho afetou significativamente a germinação das sementes, não atingindo o valor mínimo de 80% exigida pela RAS.

3.2 Patogenicidade da micoflora associada às sementes de milho

Depois de um período de 48h, e após a pulverização dos fitopatógenos nas folhas já foi possível observar sintomas provocadas pelos fungos *Curvularia* sp. e *Exserohilum* sp. Num período de sete dias, todas as plântulas apresentaram sintomas característicos das doenças causadas pelos fungos inoculados (Figura 01).

Folhas inoculadas com o isolado do fungo *Exserohilum* sp, apresentaram lesões necróticas da cor de palha; as folhas pulverizadas com conídios de *Curvularia* sp, mostraram pequenas lesões elípticas necróticas por todo o limbo, e as inoculadas com *Fusarium* sp apresentaram podridão no caule e tombamento. Dessa forma, comprovou-se que os três gêneros se apresentaram patogênicos as plântulas de milho.

Uma doença foliar pode deixar a planta mais susceptível para um patógeno que causa doenças no colmo. De acordo com Brito (2008) as doenças fúngicas que provocam destruição foliar causam prejuízos ao processo de nutrição da planta durante a fotossíntese, pois impedem a absorção de luz e a translocação de fotoassimilados, provocando assim sérias complicações em outros órgãos do vegetal. A planta necessita de fotoassimilados suficientes para a manutenção dos tecidos e quando não produzem

essa quantidade, deixam os tecidos da base do colmo e da raiz mais propensos a doenças (TOLLENAAR et al., 1994).

3.3 Fitotoxicidade do óleo essencial de noni às plântulas de milho

Para o teste de fitotoxidez com concentrações de 1% à 5%, com exceção das plântulas com concentração de 1%, todas as outras apresentaram aspectos de clorose e necrose no limbo das folhas, além de tombamento. Esses aspectos aumentaram gradativamente com o aumento da dose do óleo aplicado em cada plântula (Tabela 02).

Brito et al. (2010) destaca que em seus experimentos utilizando óleos essenciais voláteis de citronela e eucalipto (*Eucalyptus citriodora*) em concentrações de 5; 10 e 15% para avaliar a fitotoxidade em plântulas de milho, verificaram que os sintomas aumentaram em função do aumento das concentrações.

Para as plântulas com concentração de 1% do óleo, as folhas pareciam ter apresentado aspectos de clorose muito leve. Os resultados obtidos nesta avaliação serviram de parâmetros para a avaliação com outras doses desse óleo, menores daquela que causou menor fitotoxidez.

Para o teste de fitotoxidade, utilizando doses de 0,1 a 1,5%, observou-se que houve sintomas de fitotoxidade apenas nas plântulas onde foram aplicadas as concentrações de 1; 1,25 e 1,5%. Para as três concentrações, as plântulas apresentaram alta necrose no caule a ponto de levar ao tombamento.

3.4 Controle de fitopatógenos e germinação de sementes de milho utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de noni

Diante das análises das sementes constatou-se a presença dos fungos *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp, e *Rhizopus* sp., que são considerados fungos contaminantes ou de armazenamento, e *Fusarium* sp., e *Curvularia* sp., patogênicos na cultura do milho (Figura 02). De acordo com França et al. (1992) um dos principais fatores que determinam a

incidência dos fungos em sementes e grão é o fator climático.

O fitopatógeno *Curvularia* sp., apresentou-se em apenas 0,5% das sementes tratadas com a menor concentração (0,1%). Em nenhum outro tratamento e também na testemunha não houve incidência desse fungo, o que inviabilizou avaliar a eficiência das concentrações do óleo em escala progressiva do para o controle do mesmo. *Fusarium* sp. foi o fungo fitopatogênico de maior ocorrência nas sementes deste ensaio. Todos os tratamentos apresentaram uma redução na incidência desse patógeno em relação à testemunha. Os resultados em geral revelam efeitos positivos dos tratamentos sobre o controle, tanto de fitopatógenos, quanto de contaminantes, à medida que se aumentou a concentração dos óleos. Algumas pesquisas com o mesmo tipo de tratamento apresentam resultados bem diversificados.

Pode-se afirmar a eficiência do óleo essencial de noni neste bioensaio, atuando de forma a diminuir a ocorrência de fitopatógenos, principalmente de *Fusarium* sp. que foi o que apresentou maior incidência nas sementes. Os resultados, para este ensaio, revelam que a concentração de 1,5% foi a mais eficiente para todos os gêneros.

Todas as concentrações utilizadas como tratamento para as sementes de milho revelaram valores menores de germinação em relação à testemunha, porém, a germinação foi mais afetada na concentração de 1,5%, apresentando esta 75,5% de sementes germinadas e, assim, não atendendo o mínimo estabelecido pelas RAS. A regressão quadrática apresentada no gráfico (Figura 02) demonstra que com o aumento das concentrações a tendência foi a diminuição da germinação das sementes.

As sementes são grandes transmissoras de patógenos para as plantas, por esse motivo, o tratamento realizado nas sementes para combater os patógenos associados é de grande relevância para uma melhor e maior produtividade das culturas. Neergaard (1979) destaca que mais de 50% das doenças nas plantas são causadas por transmissão

via sementes e, com isso, o controle dos patógenos da cultura pode impactos possibilitar uma redução significativa na utilização de produtos químicos, minimizando os causados por eles ao meio ambiente.

3.5 Inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp., *Exserohilum* sp. e *Curvularia* sp. utilizando diferentes concentrações do óleo de noni

Para quase todas as concentrações o crescimento micelial foi menor em relação à testemunha e a concentração de 1,5% foi a mais eficiente no controle dos três patógenos.

Observou-se que os tratamentos com maiores concentrações do óleo essencial de noni tiveram melhor efeito sobre o crescimento micelial dos isolados de *Fusarium* sp., *Exserohilum* sp. e *Curvularia* sp., com exceção da concentração de 0,5% para *Exserohilum* sp., que obteve maior crescimento em relação a testemunha (Figura 03).

De acordo com Moura et al. (2014) pesquisas com óleos essenciais e extratos bruto obtido a partir de plantas da flora nativa vem demonstrando potencial no controle de fitopatógenos pela sua ação fungitóxica, inibindo assim, o crescimento micelial e a germinação de esporos, o que pode ser causado pela indução de fitoalexinas. Para Purkayastha (1995) as fitoalexinas são metabólitos secundários e antimicrobianos que são capazes de inibir a ação de fungos patogênicos e são produzidas pela planta quando a mesma passa por estresses químicos, físicos ou biológicos.

4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de noni foi o que mais se destacou para o controle de fitopatógenos.

Os fungos *Fusarium* sp., *Curvularia* sp. e *Exserohilum* sp. foram patogênicos às plântulas de milho.

O óleo de noni apresentou-se fitotóxico para as plântulas de milho em concentrações a partir de 1%. e em concentrações de 0,1% à 1,5% se mostrou eficiente

no controle de *Fusarium* sp quando aplicado diretamente sobre as sementes.

A inibição do crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos foi proporcional ao aumento das concentrações do óleo essencial de noni.

REFERÊNCIAS

Bettiol, W.; Morandi, A. B. **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas.**

Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 334p, 2009.

http://www.cnpma.embrapa.br/download/livro_biocontrole.pdf

Bakkali. F.; S, Averbeck.; D. Averbeck. Biological effects of essential oil: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-75, 2008.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507004541>

Barnett, H.C.; Hunter, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3.ed. Mineapolis: Burgess Publishing, 2010. **Fourth edition**, 218p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, 2009. 395p.

Brito.A.H.; Pinho. R.G.; Filho.A.X.S.; Altoé.T.F. Avaliação da severidade da cercosporiose e rendimento de grãos em híbridos comerciais de milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.7,n.1,p. 19-31,2008. <http://rbms.cnpms.embrapa.br/index.php/ojs/index>

Brito.D.R.; Ootani.M.A.; Ramos.A.C.C.; Sertão.W.C.; Aguiar.R.W.S.; Brito.N.M.;

Nascimento.L.C.; Coelho,M,S,E.; Félix,L.P. Efeitos de óleos essenciais na germinação de sementes de *Cereus jamacaru*. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.5, n.2, p. 207-211,2010.

http://agraria.pro.br/sistema/index.php?journal=agraria&page=article&op=viewArticle&path%5B%5D=agraria_v5i2a702

Camatti-Sartori, V.; Magrini, F.E.; Crippa, L.B.; Marchett, C.; Venturin, L.; Silva-Ribeiro,

R.T. Avaliação *in vitro* de extratos vegetais para o controle de fungos patogênicos de flores. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.6, n.2, p.117-122, 2011.

<http://www.abaagroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/9904>

Cogliatti.M.; Juan.V.F.; Bongiorno.F.; Dalla.V.H.; ROGERS.W.J. Control of grassy weeds in annual canary grass. **Crop Protection**, v.30, n.2, p. 125-129, 2011.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261219410003248>

Coitinho,R.L.B.C.; Oliveira.J.V.O.; Gondim.M.G.C.; Camara.C.A.G. Persistência de óleos essenciais em milho armazenado, submetido à infestação de gorgulho do milho. **Ciência Rural**, v.40, n.7, p. 1492-1496, 2010.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782010000700002

Combrinck.S.; Regnier.T.; Kamatou,G.P.P. In vitro activity of eight essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, v.33, n.7, 344-349, 2011.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0926669010003110>

Cruz.J.C., Pereira-Filho.I.A., Alvarenga.R.C., Contijo-Neto.M.M., Viana.J.H.M., Oliveira.M.F., Matrangolo.W.J.R., Albuquerque-Filho.M.R. **Cultivo do milho**. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). 6ªed. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2010. (Sistema de produção, 1).

http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_6_ed/manejomilho.htm

Dequech.S.T.B, Ribeiro.L.P, Sausen.C.D, Egewarth.R, Kruse.N.D. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**, v.15, n.1, p. 71-80, 2008.

<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/3703>

Ferreira.D.F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência . agrotecnológica**, vol.38, n.2,p. 109-112, 2014.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542014000200001

França.J.B.; Henning.A.A. **Diacom: diagnóstico completo da qualidade da semente de soja**, Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 22 p,1992. (EMBRAPA-CNPSo, Circular Técnica, 10). file:///C:/Users/sony/Downloads/10.pdf

Freitas.S.P.; Moreira.J.G.; Freitas,I.L.J.; Freitas Júnior. S.P; Amaral Júnior. A. T.; Silva.V.Q.R. Fitotoxicidade de herbicidas a diferentes cultivares de milho-pipoca. **Planta Daninha**, v. 27, n. spe, p.1095-1103, 2009.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582009000500023

Guimarães,L.G.L.; Cardoso,M.G.; Sousa,P.E.; Andrade,J.; Vieira,S.S. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral, **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2 464-472, 2011.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-66902011000200028

http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S141370542007000100013&script=sci_abstract&lng=pt

Moura.G.S, Franzener.G, Stangarlin.J.R, Scchwan-Estrada.K.R.F. Atividade antimicrobiana e indutora de fitoalexinas fazer hidrolato de carqueja [*Baccharis trimera* (Less.) DC.]. **Revista brasileira de plantas medicinais**. vol.16, n.2, p.309-315, 2014.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000500001

Neergaad.P. **Seed pathology**. 2ed. London: Mc Millan Press,1979. 839p.

Pereira, R.B.; Lucas, G.C.; Perina, F.J.; Resende, M.L.V.; Alves, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência Agrotecnológica**, v.35, n.1, p.115-123, 2011_ http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542011000100014

Purkayastha,R.P. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: DANIEL,

M.; PURKAYASTHA, R. P (Ed). **Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action**. New York: Marcel Dekker,1995. p.1-39.

Saito.M.L, Scramim.S. 2000. **Planta aromáticas e seu uso na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 48p.

Seixas, P.T.L.; Castro, H.C.; Santos, G.R.; Cardoso, D.P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.13, especial, p.523-526, 2011.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722011000500003&lng=pt&nrm=iso

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

<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n4/a10v16n4.pdf>

Souza Filho. A.P.S, Bayma. J.C, Guilhon. G.M.S.P, Zoghbi, M.G.B. Atividade potencialmente alelopática do óleo essencial de *Ocimum americanum*. **Planta daninha**, vol.27, n.3, p. 499-505, 2009.

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582009000300010

Tollennar.M.; McCullough.D.E, Dwyer.L.M. Physiological basis of the genetic improvement of corn. In: SLAFER, G.A. **Genetic improvement of field crops**. New York: Marcel Dekker Inc, 1994. Ch.4:183-23

Tabela 01: Médias estatísticas da incidência de fungos presentes em sementes de milho (*Zea mays*) e germinação das sementes tratadas com concentração de 5,0% e 20,0% de óleos fixos e essenciais. Gurupi -TO, 2015

Incidência de Fungos e Germinação (%)															
	<i>Aspergillus</i> sp.		<i>Penicillium</i> sp.		<i>Fusarium</i> sp.		<i>Rhizopus</i> sp.		<i>Exserohilum</i> sp.		<i>Curvularia</i> sp.		Germinação		
[] Óleo	5,00%	20,00%	5,00%	20,00%	5,00%	20,00%	5,00%	20,00%	5,00%	20,00%	5,00%	20,00%	5,00%	20,00%	
Andiroba	6,3eB	22,0cA	78,5bA	69,0bA	12,0bA	20,5bA	1,5aA	0,0aA	0,0aA	1,0Aa	0,0aA	0,5aA	96,5aA	80,0bB	
Buriti	17,0cB	31,0bA	68,0bA	67,5,bA	31,5aA	20,0bA	1,5aA	0,0aA	1,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	88,0bA	84,5bA	
Copaíba	31,0bA	17,0cB	77,5bA	68,5bA	16,5bA	9,0bA	0,5aA	0,0aA	0,0aA	0,5aA	1,0aA	0,5aA	91,0aA	86,0bA	
Macaúba	13,0dA	12,0dA	70,5bB	83,5aA	12,0bA	17,5bA	2,5aA	1,5aA	0,5aA	0,5aA	0,0aA	0,0aA	74,5cA	82,0bA	
Mamona	7,5dA	11,5dA	89,5aA	88,0aA	34,0aA	6,0cB	5,5aA	2,5aA	0,0aA	1,5aA	0,0aA	0,5aA	83,0bB	96,5aA	
Neem	4,5eA	10,0dA	83,5aA	73,0bB	4,0cb	22,0aA	0,0aA	2,5aA	0,5aA	0,5aA	0,0aA	1,0aA	94,0aA	80,0bB	
Capim-limão	4,0eA	0,0fB	1,5cA	0,5cA	18,0bA	0,5dB	0,5aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	92,0aA	7,0cB	
Citronela	81,5aA	0,0fB	1,5cA	0,0cA	31,5aA	0,0dB	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	53,5dA	11,50cB	
Noni	2,5eA	0,0fB	0,0cA	0,0cA	2,0cA	0,0dA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	0,0aA	49,0dA	0,0dB	
Testemunha	27,5		86,0		12,0		4,0		1,5		0,0		97,0		
Média	18,6	11,5	52,27	41,11	17,9	10,6	1,3	0,7	0,2	0,6	0,1	0,3	80,1	58,44	

CV% 22,82

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha, não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$)

**Médias originais foram transformadas em arco seno de $\sqrt{x/100}$

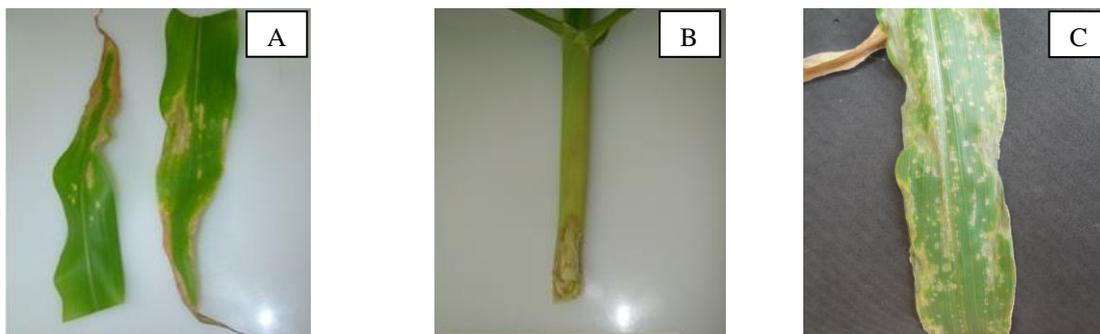


Figura 01: Lesões necróticas de cor marrom causados por *Exserohilum* sp. (A), podridão do caule causada por *Fusarium* sp. (B) e pequenas lesões elípticas causadas por *Curvularia* sp. (C) representando os sintomas detectados em teste de patogenicidade

Tabela 02: Fitotoxidez em plântulas de milho em função da aplicação de doses crescentes de óleo essencial de noni. Gurupi-TO, 2015

Concentrações	Características
0 (água)	Ausência de fitotoxidade
0,1%	Ausência de fitotoxidade
0,25%	Ausência de fitotoxidade
0,5%	Ausência de fitotoxidade
0,75%	Ausência de fitotoxidade
1%	1- 25% leve clorose ou início de necrose nas folhas das plântulas
2%	1- 25% leve clorose ou início de necrose nas folhas das plântulas
3%	26- 50% clorose ou necrose média nas folhas das plântulas
4%	51-75% alta clorose ou alta necrose nas folhas das plântulas
5%	51-75% alta clorose ou alta necrose nas folhas das plântulas

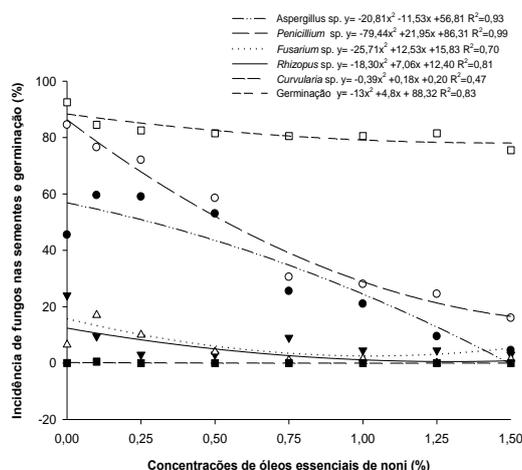


Figura 02: Incidência de fungos e germinação de sementes de milho tratadas com diferentes concentrações de óleo de noni (*Morinda citrifolia* L.)

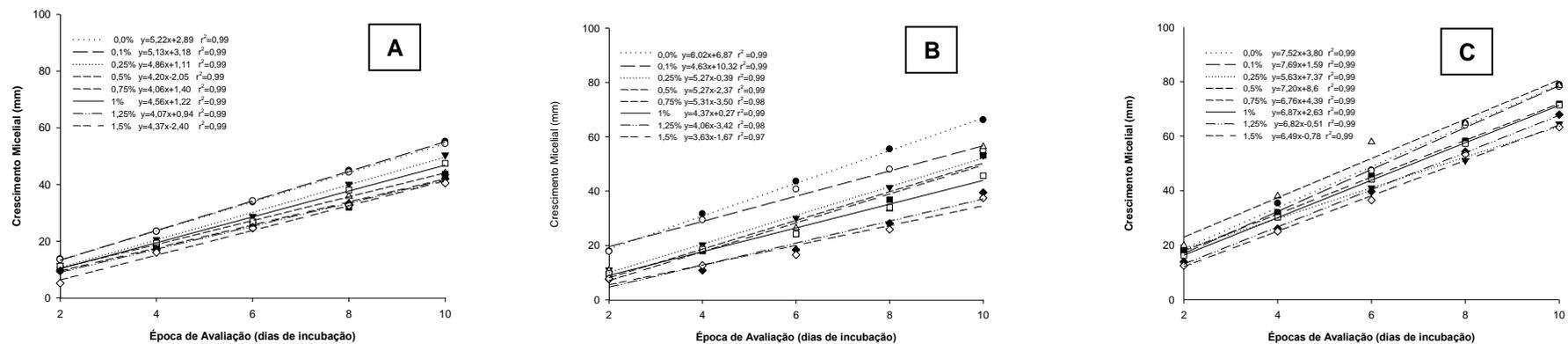


Figura 03: Inibição do crescimento micelial de *Fusarium* sp. (A), *Curvularia* sp. (B) e *Exserohilum* sp. (C) utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.)

CAPÍTULO II

EFICIÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE NONI (*Morinda citrifolia* L) NO CONTROLE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE *Exserohilum turcicum* NA CULTURA DO MILHO

Eficiência do óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.) no controle da mancha foliar causada por *Exserohilum turcicum* na cultura do milho

SILVA, J.C.¹; CARLOS, D.S.²; LIMA, F.S.O.³; LEÃO, E.U.²; VELOSO, R.A.²; SANTOS, G.R.^{2*}. ¹IFTO, Povoado Santa Tereza, Km 05, Araguatins-TO, CEP:77950-000, araguatins@ifto.edu.br; ² UFT, Rua Badejós, Lote 7, Chácara 69/72, Zona Rural, Gurupi-TO, CEP:77402-970, dirgurupi@uft.edu.br; ³IFTO, Rodovia TO 040, Km 349, Dianópolis-TO, CEP: 77.300-00, dianopolis@ifto.edu.br.
*gilrsan@uft.edu.br

Resumo

Pesquisas com óleo essencial de noni como método de controle alternativo para doenças de plantas ainda são escassas. Diante disso, o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência desse óleo essencial no controle de *Exserohilum turcicum*, agente causal da mancha de *Exserohilum* na cultura do milho. No teste de sanidade 400 sementes foram incubadas pelo método Blotter Test. Para o teste de transmissibilidade foram retirados fragmentos de folhas lesionadas de plântulas, colocados em meio de cultura BDA e levados à incubadora. Para a verificação da patogenicidade foram realizados os Postulados de Koch. No teste de fitotoxidez utilizou-se diferentes concentrações de óleo de noni aplicadas em plântulas de milho. Conídios de *E. turcicum* foram submetidos a diferentes concentrações de óleo de noni. No preventivo e curativo foi aplicado óleo essencial de noni antes e após a inoculação dos conídios, respectivamente. Os resultados revelaram a presença dos fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium* e *Exserohilum* nas sementes de milho. Foi confirmada a

patogenicidade de *E. turcicum* e também a transmissão desse fungo das sementes para as plântulas de milho. As concentrações a partir de 1% de óleo de noni foram fitotóxicas às plântulas de milho. A inibição da germinação dos conídios foi proporcional ao aumento das concentrações. A aplicação preventiva do óleo essencial de noni foi mais eficiente no controle da Mancha de *Exserohilum* do que a aplicação curativa.

Palavras chave: Controle alternativo. Plantas medicinais. *Zea mays*. *Exserohilum turcicum*.

Abstract: Efficiency of essential oil of noni (*Morinda citrifolia* L.) in control of corn leaf spot caused by *Exserohilum turcicum*

Keywords: Alternative control. Medicinal plants. *Zea mays*, *Exserohilum turcicum*

Research with essential oil of noni as an alternative control method for plants are still rare diseases. Thus, the objective of this study was to evaluate the efficiency of this essential oil in the control *Exserohilum turcicum*, causal agent of *Exserohilum* spot in maize. In health test 400 seeds were incubated at Blotter Test method. To test transferability were removed injured fragments of leaves of plantlets placed on PDA culture medium and taken to the incubator. To check the pathogenicity was performed Postulate Koch. In phytotoxicity test was used noni oil different concentrations applied in maize seedlings. *E. turcicum* Conidia were subjected to different noni oil concentrations. In the preventive and curative essential oil was applied noni before and after inoculation, conidia, respectively. The results revealed the presence of fungi of the genus *Aspergillus*, *Penicillium*,

Rhizopus, Fusarium and Exserohilum in corn seeds. It was confirmed the pathogenicity of *E. turcicum* and also the transmission of this fungus of seed for corn seedlings. Concentrations from 1% noni oil were phytotoxic corn seedlings. Inhibition of spore germination was proportional to the increase of concentrations. Preventive application of essential oil noni was more effective in controlling Mancha *Exserohilum* than curative application.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das culturas anuais muito susceptíveis ao ataque de fungos patogênicos transportados via semente, pelo fato dessa planta ser uma espécie que apresenta duas fases de desenvolvimento: uma reprodutiva e outra vegetativa (Cury et al., 2012). Fungos do gênero *Exserohilum* são responsáveis por causarem doenças foliares, podendo ocasionar danos tanto quantitativos como qualitativos (Pinto, 2004). O *E. turcicum* pode causar perdas significativas, pois quando em épocas de epidemia pode atingir até 100% das plantas (Ramathani et al., 2011)

O uso de pesticidas tem causado graves problemas ambientais e na saúde humana, elevando assim, a busca de produtos alternativos que substituam esses compostos químicos (Sarmiento-Brum et al., 2014). Os óleos essenciais têm apresentado em pesquisas, grande potencialidade no controle de fitopatógenos, procurando assim diminuir a incidência desses microrganismos patogênicos que causam prejuízos tanto na agricultura quanto na indústria alimentícia (Bakkali et al., 2008). Os óleos essenciais são extraídos de partes vegetais e são formados por mistura de substâncias voláteis, lipofílicas e com baixo peso molecular, existindo vários métodos para sua extração (Morais, 2009).

O noni (*Morinda citrifolia* L.) pertencente à Família Rubiaceae é uma planta nativa da Malásia, Austrália, Índia e sudeste da Ásia, e tem crescido em muitas regiões do mundo, se tornando conhecida por todo o povo do mundo tropical. Antigos viajantes polinésios levavam intencionalmente a fruta do noni para tratar várias doenças que atingiam pessoas da época: feridas, tumores, queimaduras, irregularidades menstruais, entre outros (Gonzalez Lavaut, Nirida & Gonzalez Lavaut, José A, 2003).

No entanto, alguns relatos utilizando o extrato desse vegetal e avaliando seu efeito fungitóxico em plantas já foram publicados, mas pesquisas comprovando as potencialidades do óleo essencial de noni no controle alternativo de doenças em vegetais ainda são bastante escassos. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a eficiência do óleo essencial de noni no controle da mancha foliar de *Exserohilum* na cultura do milho.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal do Tocantins, Campus Universitário de Gurupi, utilizando-se sementes de milho (tipo crioulo) obtidas de lotes de cinco produtores presentes em feira comercial, sendo produzidas no ano de 2015, no município de Gurupi-TO. Estas sementes foram misturadas e depois utilizadas nos testes de sanidade e transmissibilidade. Para os testes de patogenicidade, fitotoxicidade e preventivo e curativo foram utilizadas sementes de milho (híbrido 30F53YH) tratadas com fungicida.

Frutos maduros de noni, coletados na região de Gurupi, foram lavados em água corrente, cortados em pequenos cubos e submetidos à extração de óleo

essencial pelo método de hidrodestilação. Em um balão de fundo redondo foram colocados 200g de frutos maduros de noni. Em seguida, o balão foi acoplado a um destilador tipo Clevenger, por um período de duas horas. Após a extração, o óleo essencial foi coletado na forma de sobrenadante, depositado em frasco âmbar, identificado e armazenado a 4°C.

2.1 Sanidade de sementes de milho

Após a mistura das sementes adquiridas, estas foram incubadas em um total de 400 sementes, pelo método do Blotter Test. O delineamento foi o inteiramente casualizado (DIC) com oito repetições. Utilizou-se 16 caixas de acrílico tipo gerbox previamente desinfestadas e forradas com papel filtro esterilizado e umedecido com água estéril. Para cada repetição foram consideradas duas caixas de gerbox. Todo o material foi acondicionado em câmara incubadora sob temperatura de 25°C durante sete dias, com foto período 12h de luz.

As análises foram realizadas utilizando-se microscópio estereoscópio e óptico, além da consulta para identificação dos fungos em manual especializado de Barnett & Hunter (2010), sendo os dados apresentados em porcentagem.

2.2 Transmissibilidade semente-plântula de *Exserohilum turcicum*

O delineamento foi o DIC com 04 repetições. O substrato foi constituído de uma mistura de areia fina lavada e latossolo vermelho-amarelo na proporção de 1:1 que foi submetido a desinfestação por solarização durante sete dias. Em seguida, um total de 400 sementes foram semeadas em oito bandejas contendo o substrato. A umidade foi mantida por meio de irrigações diárias. No período de trinta dias foi realizada a contagem da germinação em cada bandeja e amostras

de folhas com manchas foram retiradas. Após a assepsia com álcool (70%), hipoclorito (1%) e água destilada/esterilizada (D/E) os fragmentos das folhas foram incubados em meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar). As placas foram vedadas, identificadas e levadas à câmara de incubação à 25°C com fotoperíodo de 12h de luz por um período de dez dias.

2.3 Patogenicidade de *Exserohilum turcicum* às plântulas de milho

O fungo *E. turcicum* foi obtido de sementes de milho incubadas pelo método Blotter Test e transferido para o meio de cultura BDA em placas de Petri (90mm) que ficaram acondicionadas em câmara incubadora por 15 dias, com temperatura média de 25°C e fotoperíodo de 12h de luz até o crescimento micelial atingir a borda das placas. Posteriormente, os conídios formados nas placas foram quantificados em câmara de Neubauer, e foram obtidas suspenções de $1,25 \times 10^6$ conídios/mL de *E. turcicum*. Em seguida, com auxílio de um borrifador manual foram aplicados no limbo foliar de plântulas de milho. As plantas inoculadas foram acondicionadas em câmara úmida e escura, proporcionada por saco plástico envolvendo algodão embebido em água estéril por um período de 48h a 25°C, e depois foram mantidas em temperatura ambiente por sete dias.

Visando cumprir os Postulados de Koch foram retirados fragmentos das lesões que surgiram nas folhas após quatro dias da inoculação. Em seguida foi realizada assepsia dos fragmentos lesionados em álcool (70%), hipoclorito (1%) e água estéril. Depois, foi feito o plaqueamento em meio de cultura BDA. As placas foram vedadas com papel filme, identificadas e levadas à câmara de incubação por um período de sete dias para verificação do crescimento do fitopatógeno.

2.4 Análise cromatográfica do óleo essencial de noni

A análise cromatográfica foi realizada na Universidade Federal de Viçosa-MG. A identificação e quantidade dos constituintes foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa CG-EM.

2.5 Fitotoxicidez em plântulas de milho utilizando diferentes concentrações de óleo essencial de noni

Sementes de milho do híbrido 30F53YH tratadas com fungicida foram semeadas em vasos de polietileno constituindo quatro repetições. O delineamento utilizado foi o DIC com oito tratamentos (concentrações de óleo essencial de noni em 0,0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,25 e 1,5%) e três repetições. A solução de 10 mL de cada concentração de óleo essencial de noni (dissolvido em Tween 80 a 1%) foi aplicada nas folhas das plântulas de milho com auxílio de um borrifador, e a análise do efeito fitotóxico foi realizada 48h após a sua aplicação.

Para a avaliação da fitotoxicidade utilizou-se a escala adaptada de Dequech et al. (2008), Freitas et al. (2009) e Cogliatti et al. (2011), sendo: 0= para ausência de fitotoxicidade; 1-25= leve clorose ou início de necrose nas folhas das plântulas; 26- 50= clorose ou necrose média nas folhas das plântulas; 51-75=alta clorose ou alta necrose nas folhas das plântulas; 76 -100= murcha e ressecamento da planta.

2.6 Germinação de conídios de *Exserohilum turcicum* em função de diferentes concentrações do óleo essencial de noni

O delineamento utilizado foi o DIC com cinco tratamentos (concentrações de óleo de noni na ordem de 0,0; 0,1; 0,25; 0,5 e 0,75%) e quatro repetições. Para cada tratamento foi realizada uma mistura, em frasco esterilizado, de 1.000µl de suspensão de conídios e 1.000µl da solução do óleo essencial de noni. Logo

após, os frascos foram acondicionados em câmara incubadora onde permaneceram por um período de 96h (quatro dias) para a avaliação da germinação. Após esse período, as soluções de conídios foram pipetadas e colocadas em câmara de Neubauer constituída por quatro quadrantes, onde cada quadrante constituía uma repetição. Para a contagem da germinação dos conídios contou-se 100 números de conídios totais (germinados e não germinados), no campo de visão da objetiva de 10X do microscópio óptico, em pontos distintos de cada quadrante. Calculou-se a porcentagem de germinação dos conídios. Os dados não se adequaram a nenhum modelo para as equações de regressão, logo se usou os dados originais que foram representados com auxílio do programa computacional SigmaPlot 10.0.

2.7 Controle (preventivo e curativo) da mancha de *Exserohilum turcicum* em função de diferentes concentrações de óleo essencial de noni

O delineamento foi o DIC com cinco tratamentos (concentrações de óleo de noni na ordem: 0; 0,1; 0,25; 0,5 e 0,75%), quatro repetições e cinco épocas de avaliações.

Foi realizada a semeadura de sementes de milho do híbrido 30F53YH em vasos plásticos e, após 45 dias, foi feita a aplicação dos tratamentos. As concentrações foram obtidas pela mistura do óleo essencial de noni e de água (D/E) com Tween 80 (1%). Para a obtenção da suspensão dos conídios, colocou-se 10 mL de água (D/E) em cada placa num total de 12 placas de Petri, com auxílio de um pincel de cerdas macias foi realizado o desprendimento do micélio. A solução foi filtrada em gaze e os conídios foram quantificados em câmara de

Neubauer. Os dados foram ajustados obtendo-se assim uma média de $1,86 \times 10^6$ conídios/mL.

No teste de controle preventivo foram aplicados primeiramente os cinco tratamentos com as concentrações do óleo de noni. Após duas horas foi pulverizada nas folhas uma solução de 10 mL da suspensão dos conídios de *E. turcicum* em cada plântula de milho. Em seguida, os vasos foram submetidos à câmara úmida e escura à temperatura de 25°C por um período de 48h.

Para o controle curativo, primeiramente foi aplicado nas folhas das plântulas de milho, 10 mL da solução contendo os conídios do fungo. Na sequência, as plântulas foram submetidas também à câmara úmida e escura por um período de 48h e, após esse período foi feita a aplicação dos tratamentos com as concentrações do óleo. Todas as plantas tratadas, tanto no controle preventivo como no curativo, foram expostas ao ambiente natural (temperatura de 30°C \pm 4°C, umidade relativa do ar entre 25 a 35%) por um período de dez dias, sendo feitas as avaliações em períodos intercalados de 48h.

As avaliações de severidade da doença foram realizadas por meio da escala de notas adotada por Santos et al. (2005) onde 0= planta sadia; 1= menos de 1% da área foliar doente; 3= 1 a 5 % da área foliar doente; 5= 6 a 25 % da área foliar doente; 7= 26 a 50 % da área foliar doente; 9= mais que 50% da área foliar doente.

As notas de severidade foram utilizadas para obtenção dos valores da AACPD (Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença). Os valores da AACPD foram calculados pela expressão: $AACPD = S (y_i + y_{i+1})/2 \cdot dt_i$, onde y_i e y_{i+1} são os valores de severidade observados em duas avaliações consecutivas e dt_i o

intervalo entre as avaliações (Shaner & Finney, 1977). Determinada a AACPD esta foi plotada *versus* a concentração a fim de representar a evolução da doença de acordo com as concentrações do óleo essencial de noni no controle preventivo e curativo. Os dados foram submetidos à regressão calculando-se o coeficiente de determinação e o modelo que melhor se ajustou aos dados foi da equação quadrática. O programa computacional utilizado foi o SigmaPlot 10.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Sanidade de sementes de milho

As análises revelaram que os fungos transportados pelas sementes foram *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp, *Rhizopus* sp e *E. turcicum* com incidência respectivamente de 27,5; 86; 12; 2 e 1,5% (Figura 01). Os gêneros *Fusarium* e *Exserohilum* são considerados fitopatogênicos, e os outros são fungos contaminantes ou presentes em grãos armazenados. Em todas as sementes foram detectados fungos patogênicos ou não patogênicos. O transporte e a transmissão desses fungos pelas sementes é um mecanismo de sobrevivência e disseminação desses patógenos para novas áreas. Fessel et al. (2003) ao analisarem a qualidade sanitária de sementes de milho verificaram a ocorrência dos fungos *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Aspergillus* sp., *Cephalosporium* sp. e *Penicillium* sp. Pesquisas demonstram que os fungos dos gêneros *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium* são os mais incidentes em sementes de milho. Ferreira (2001) destaca que o patógeno *E. turcicum* sobrevive de um ano para outro, em restos de cultura (na forma de micélio e conídios), sementes, plantas remanescentes ou em hospedeiros alternativos.

De acordo com Agarwal & Sinclair (1987) os fungos associados as

sementes podem ser transportados por infestação ou infecção. A infestação é causada por fungos contaminantes que são aqueles que se aderem à superfície das sementes. Já a infecção é causada por fungos que se encontram internamente no tecido da semente, sendo estes os causadores de doenças em plantas.

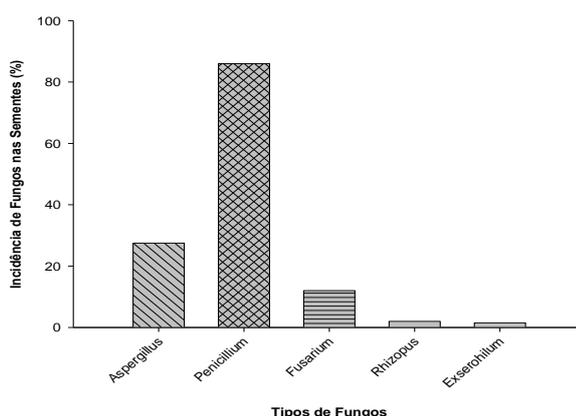


FIGURA 01: Sanidade de sementes de milho (*Zea mays* L.) obtidas da feira comercial do município de Gurupi-TO no ano de 2015

3.2 Transmissibilidade semente-plântula de *Exserohilum turcicum*

A transmissão de *E. turcicum* das sementes para as plântulas foi confirmada com incidência desse patógeno em 4% das plântulas de milho. Estas apresentaram sintomas típicos da doença causada por este patógeno, como lesões inicialmente elípticas, de cor palha e bordas bem definidas. Posteriormente, com a evolução da doença as lesões tornaram-se escuras e de formato comprido. As placas de meio de cultura com fragmentos das folhas lesionadas comprovaram a presença do patógeno, e o micélio cresceu em todas as amostras demonstrando por meio deste teste, sua capacidade de ser transmitido via semente, causando lesões foliares típicas da mancha de *Exserohilum*.

3.3 Patogenicidade de *Exserohilum turcicum* às plântulas de milho

O fungo *E. turcicum* foi confirmado como sendo patogênico às plântulas de milho, completando-se desta forma os Postulados de Koch. As folhas onde foram inoculados os conídios do fungo apresentaram inicialmente manchas elípticas necróticas de cor marrom-escura, que depois evoluíram para lesões grandes de formato comprido e com aspecto de folhas secas características da doença.

Casela et al. (2006) afirmam que os sintomas típicos de doenças causadas pelo gênero *Exserohilum* ocorrem inicialmente nas folhas inferiores, com necroses de coloração que podem variar de verde-cinza a marrom. Ao inocular conídios de dez isolados de *E. turcicum* em plântulas de milho ROSSI et al. (2015) verificaram, após 15 dias, uma média de 2,5 lesões/folha; de 39,7 x 3,4mm de comprimento e largura respectivamente e 4% de severidade, comprovando-se assim que todos foram patogênicos à cultura.

Pereira (1995) destaca que a Mancha de *Exserohilum* ocorre em regiões de climas moderados (18 a 27°C) como a região Sul e nas chapadas da região Centro-Oeste, pois possuem clima favorável para o seu crescimento. Observou-se no decurso do trabalho que a doença vem afetando a cultura do milho no Sul do estado do Tocantins, apesar de ser uma região de clima tipicamente quente. Segundo Chagas et al. (2015) uma das possíveis causas do aumento da severidade em doenças no estado do Tocantins é a condição climática favorável. Estes autores ressaltam também que a identificação de doenças foliares, o entendimento dos aspectos relacionados ao seu desenvolvimento e o conhecimento da eficiência das medidas de controle são fundamentais para a expansão da cultura do milho no estado.

3.4 Análise cromatográfica do óleo essencial de noni

Os constituintes do óleo de noni foram identificados comparando seus espectros de massas com aqueles dos bancos de dados das bibliotecas Nist e Wiley 229. Alguns compostos tiveram suas identidades confirmadas por meio da comparação entre os seus índices de retenção calculados com aqueles presentes no *webbook Nist* e com a literatura (ADAMS, 2007). A Tabela 01 mostra a porcentagem relativa (área %) dos constituintes do óleo essencial de noni e indica que o composto majoritário encontrado foi o ácido octanóico ou caprílico (82,24%), seguido do ácido hexanóico ou capróico (8,26%).

TABELA 01. Porcentagem relativa (Área %), obtida por Cromatografia à Gás acoplada a Detector de Espectrometria de Massas, dos constituintes do óleo essencial de frutos maduros de noni (*Morinda citrifolia* L.)

Compostos	NC	TR	IR	(%)
Acetato de 3-metil-but-3-enila	1	4.583	888	-*
Heptan-2-ona	2	4.992	897	-
Hexanoato de Metila	3	5.774	922	-
Ácido Hexanóico	4	7.634	987	8,26
Hexanoato de Etila	5	7.974	999	2,48
Octanoato de Metila	6	12.713	1123	-
Ácido Octanóico	7	15.603	1177	82,24
Octanoato de Etila	8	15.803	1196	-
Hexanoato de Isopentila	9	18.537	1259	1,6
Hexanoato de 3-metil-but-2-enila	10	19.983	1292	-
Não identificado	11	24.026	-	-
Octanoato de 3-metilbutila	12	26.897	1457	4,25
Octanoato de 3-metilbut-2-enila	13	28.226	1489	-
Teor de óleo essencial (%)				0,20

NC = Número de compostos; TR = Temperatura de retenção; IR = Índice de retenção calculado

* Não quantificado (valores < 0,05)

3.5 Fitotoxicidez em plântulas de milho utilizando diferentes concentrações

de óleo essencial de noni

Para o teste de fitotoxicidade, utilizando doses de 0,1 a 1,5% de óleo essencial de noni, observou-se que houve sintomas de fitotoxicidade apenas nas plântulas onde foram aplicadas as concentrações de 1; 1,25 e 1,5% (Tabela 02). Para as três concentrações, as plântulas apresentaram muitas folhas com clorose e necrose. As regiões da bainha e das nervuras, onde o óleo se acumulou, apresentaram sintomas bem mais evidentes.

As plântulas onde foram aplicadas as concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 0,75% do óleo não apresentaram sintomas de fitotoxicidade. A testemunha somente com água e Tween 80 (1%) não apresentou também nenhum sintoma, demonstrando assim que o dispersante não causou nenhum tipo de dano ao tecido vegetal.

Sarmiento-Brum et al. (2014) ao avaliarem o efeito fitotóxico de óleos essenciais de capim-limão e citronela em plantas de melancia (*Citrullus lanatus*) constataram que a concentração de 1% apresentou baixa fitotoxicidade e concentrações de 2 e 4% foram altamente fitotóxicas com surgimento de necroses nas folhas, principalmente nas regiões em que a solução do óleo essencial se acumulava, como nas bordas e nervuras foliares. Além disso, os autores destacam que os metabólitos secundários, além de apresentarem grande potencial no uso da agricultura sustentável, podem ser prejudiciais interferindo o processo de desenvolvimento da planta.

As necroses decorrentes da ação fitotóxica do óleo essencial reduzem a área foliar interferindo o processo fotossintético e, conseqüente, impedindo a produção de substâncias que são fontes de energia essenciais para a

sobrevivência do vegetal. Grosso et. al. (2010) destacam que os metabólitos secundários podem trazer sérios prejuízos que atrapalham o desenvolvimento do vegetal. Podem causar ruptura das membranas reduzindo as organelas, impedir a síntese de clorofila e afetar significadamente o processo fotossintético.

Como já apresentado anteriormente, o composto majoritário do óleo essencial de noni foi os ácidos octanóico, este, em maiores concentrações, pode ter efetuado uma ação inibidora sobre o pigmento da clorofila, provocando inicialmente aspectos de amarelidão além do rompimento das membranas celulares causando assim a murcha das folhas.

TABELA 02: Fitotoxidez em plântulas de milho em função da aplicação de diferentes concentrações de óleo essencial de noni. Gurupi-TO, 2015

TRATAMENTO	CARACTERÍSTICAS
0	Ausência de fitotoxidade
0,10%	Ausência de fitotoxidade
0,25%	Ausência de fitotoxidade
0,50%	Ausência de fitotoxidade
0,75%	Ausência de fitotoxidade
1%	51-75% alta clorose ou alta necrose no caule das plântulas
1,25%	51-75% alta clorose ou alta necrose no caule das plântulas
1,50%	51-75% alta clorose ou alta necrose no caule das plântulas

3.6 Efeito do óleo essencial de noni na germinação de conídios de *Exserohilum turcicum*

A inibição da germinação dos conídios foi proporcional ao aumento das concentrações (Figura 02). Considerando a testemunha com 100% de germinação de conídios após quatro dias de incubação e comparando-a com a germinação dos conídios submetidos aos tratamentos, o teste revelou que a 0,1% da concentração do óleo houve germinação de 11,91%; em 0,25% ocorreu germinação de 7,66%; em 0,5% da concentração teve germinação de 6,18% e a

maior concentração de óleo de noni, 0,75%, apresentou maior inibição, com apenas 2,98% de germinação para essa concentração. Os fitopatógenos, ao emitirem o tubo germinativo nos tecidos dos vegetais têm a capacidade de produzir enzimas que causam sérias alterações no metabolismo que podem levar a planta à morte.

Pereira et al. (2011) verificaram que os óleos essenciais de canela (*Cinnamomum verum*) e citronela (*Cymbopogon winterianus*) reduziram a germinação de *Cercospora coffeicola* 16 horas após a inoculação, promovendo, em alguns casos, o extravasamento do conteúdo celular observado em microscopia eletrônica. Scapin et al. (2010) constataram que os extratos de mil-folhas (*Achillea millefolium*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*), cânfora (*Cinnamomum camphora*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) tiveram efeito fungitóxico sobre o crescimento do tubo germinativo de *E. turcicum*.

O resultado mostra que o composto majoritário, ácido octanóico, pode ter sido o responsável pelo efeito da inibição da germinação de *E. turcicum*, de forma que a maior concentração do óleo teve o efeito mais significativo.

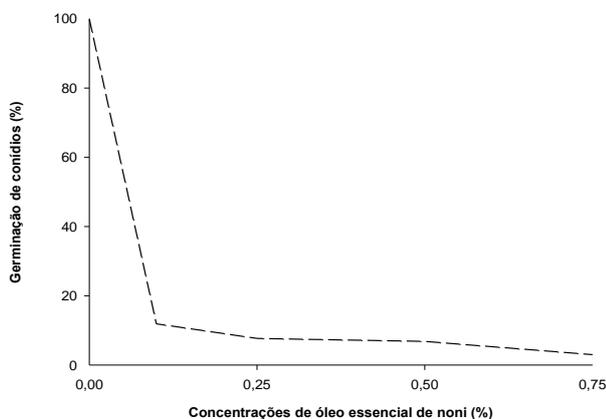


FIGURA 02: Germinação de conídios de *Exserohilum turcicum* em função de concentrações crescentes de óleo essencial de noni (*Morinda citrifolia* L.)

3.7 Controle (preventivo e curativo) da mancha de Exserohilum em função de diferentes concentrações de óleo essencial de noni

As avaliações da severidade da doença mostraram que o efeito preventivo foi positivo no controle da mancha de Exserohilum, o que não ocorreu em relação ao efeito curativo.

No preventivo, a severidade da doença diminuiu à medida que se aumentou a concentração do óleo essencial de noni. Dessa forma, a concentração de 0,75% foi a que controlou em maior grau a ação do fungo, e a de 0,1%, que teve menor eficiência de controle dentre as quatro concentrações do óleo testadas. Todas as concentrações apresentaram valores significativamente menores que o apresentado pela testemunha.

No curativo, as concentrações de 0,1; 0,25; e 0,75% apresentaram valores da AACPD menores do que a testemunha, uma diferença não tão expressiva como a apresentada pelo efeito preventivo. Já a concentração de 0,5% apresentou na escala de severidade valor maior que a testemunha. Dessa forma, não se pode afirmar que o óleo essencial de noni teve efeito positivo no controle curativo da doença, já que uma das maiores concentrações aplicadas não foi eficiente, e nas demais não demonstraram valores muito diferentes dos apresentados pela testemunha.

Lima (2007) verificou em seus trabalhos que o óleo essencial do capim citronela teve seu efeito limitado na concentração de 2.000 ppm demonstrando assim, que o óleo não teve efeito sobre a ação do fungo quando este já se encontrava no interior do tecido vegetal. Já para o efeito preventivo, ao analisar AACPD, o autor constatou que o óleo de citronela foi eficiente no controle da

ramulose do algodoeiro. Perini et al. (2011) destacam que o capim citronela, no efeito curativo, com concentração de 2%, não apresentou sintomas da doença em 50% das plantas. Já para o efeito preventivo esses autores verificaram que em concentrações de 1,5; 1,75 e 2% do óleo essencial do capim citronela aplicados em plantas de arroz, não apresentaram sintomas da doença.

Os maiores valores da concentração do óleo proporcionaram menores valores para a AACPD para o controle preventivo e houve maior ajuste do coeficiente de determinação (Figura 03). A curva evidenciou uma menor severidade na concentração de 0,75%. Já no efeito curativo a AACPD se mostrou elevada, e não há uma escala decrescente de valor em relação ao aumento das concentrações do óleo essencial assim como houve no controle preventivo.

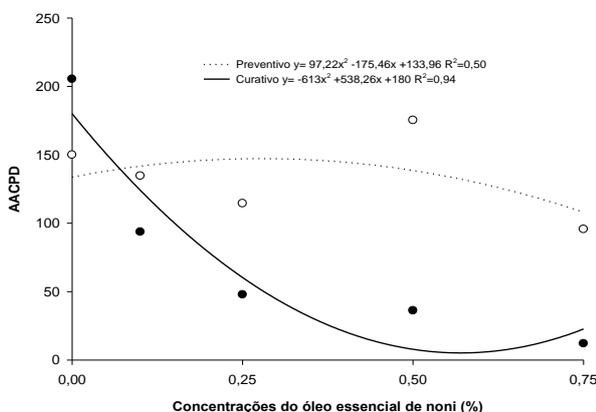


FIGURA 03: Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD) para o controle (preventivo e curativo) da Mancha de *Exserohilum* em função de diferentes concentrações de óleo essencial de noni (*Morinda Citrifolia* L.). Gurupitô, 2016

Conclui-se com este trabalho que no teste de sanidade das sementes de milho foram encontrados os fungos *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Rhizopus* sp., *Fusarium* sp. e *E. turcicum*, e que este último foi transmitido via semente-plântula.

E. turcicum foi patogênico às plântulas de milho. O composto majoritário do óleo essencial de noni foi o ácido octanóico. As concentrações acima de 1% de óleo essencial de noni foram fitotóxicas às plântulas de milho. As concentrações de óleo essencial de noni foram eficientes na inibição da germinação de *E. turcicum*. A aplicação preventiva do óleo essencial de noni foi mais eficiente no controle da mancha de *Exserohilum* do que a aplicação curativa.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL,V.K.; SINCLAIR, J.B. **Principles of seed pathology**.1.ed. Boca Raton: CRC Press,1987. 175p.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBEC, D.; WAOMAR, M. **Biological effects of essential oils - A review**. 2.ed. Food Chem Toxicol, 2008. 46: 446-475.
- BARNETT, H.C.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi**. 3.ed. Mineapolis: Burgess Publishing, 2010. **Fourth edition**, 218p.
- CASELA,C.R.; FERREIRA, A.S.; PINTO, N.F.J. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 14p. (Circular Técnica, 83).
- CHAGAS, J.F.R.;SANTOS,G.R.; COSTA, R.V.; COTA, L.V.; SILVA, D.D.;SIMON, J;MOURAO, D.S.C. **Principais Doenças Foliares da Cultura do Milho no Estado do Tocantins**. Sete Lagoas, MG: Embrapa Milho e Sorgo. 13p. (Circular Técnica, 213).
- COGLIATTI, M.; JUAN, V.F.; BONGIORNO, F.; DALLA VALLE, H.; ROGERS, W.J. Control of grassy weeds in annual canary grass. **Crop Protection**, v.30, p.125-129, 2011.
- CURY, J.P.; SANTOS, J.B.; SILVA, E.B. Acúmulo e partição de nutrientes de cultivares de milho em competição com plantas daninhas. **Revista de Planta**

Daninha, v.30, n.2, p.287-296, 2012.

DEQUECH, S.T.B.; RIBEIRO, L.P.; SAUSEN, C.D.; EGEWARTH, R.; KRUSE, N.D. Fitotoxicidade causada por inseticidas botânicos em feijão-de-vagem (*Phaseolus vulgaris* L.) cultivado em estufa plástica. **Revista da FZVA**, v. 15, n. 1, p. 71-80, 2008.

FERREIRA, A.S.; CASELA, C.R.; SANTOS, F.G.; PINTO, N.F.J.A.; RODRIGUES, J.A.S. Doenças do sorgo. In: CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; RODRIGUES, J. A. S. Eds. **Produção e utilização de silagem de milho e sorgo**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. cap. XII, p.305-340.

FESSEL, S.A.; SADER, R.; PAULA, R. C.; GALLI, J.A. Avaliação da qualidade física, fisiológica e sanitária de sementes de milho durante o beneficiamento.

Revista Brasileira de Sementes, vol. 25, nº 2, p.70-76, 2003.

FREITAS, S. P.; MOREIRA, J. G.; FREITAS, I. L. J.; FREITAS JÚNIOR, S. P.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; SILVA, V. Q. R. Fitotoxicidade de herbicidas a diferentes cultivares de milho-pipoca. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. esp., p. 1095-1103, 2009.

GONZALEZ LAVAUT, N.E.; GONZALEZ LAVAUT, J A. Morinda citrifolia Linn: potencialidades para su utilización en la salud humana. **Rev Cubana Farm**, Ciudad de la Habana , v. 37, n. 3, p. 1, dic. 2003.

GROSSO, C.; COELHO, J.A.; URIETA, J.S.; PALAVRA, A.M.F.; BARROSO, J.G.; Herbicidal activity of volatiles from coriander, winter savory, cotton lavender, and thyme isolated by hydrodistillation and supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 11007-11013, 2010.

LIMA, W.G. Controle alternativo da ramulose do algodoeiro via utilização de óleos

essenciais. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2007.

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

PEREIRA, O.A.P. Análise da situação atual de doenças do milho no Brasil e disponibilidade de germoplasma resistente. **Summa Phytopathologica**, v.21, n.1, p.67-70, 1995.

PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; PERINA, F.J.; RESENDE, M.L.V.; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35 n.1, p. 115-123, 2011.

PERINI, V.B.M.; CASTRO, H.G.; SANTOS, G.R.; AGUIAR, R.W.S.; LEÃO, E.U.; SEIXAS, P.T.L. Avaliação do efeito curativo e preventivo do óleo essencial do capim citronela no controle de *Pyricularia grisea*. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 2, n.2: p. 23-27, 2011

PINTO, N.F.J.A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.3, n.1, p.134-8, 2004.

RAMATHANI, I.; BIRUMA, M.; MARTIN, T.; DIXELIUS, C.; OKORI, P. Disease severity, incidence and races of *Setosphaeria turcica* on sorghum in Uganda. **Journal of Plant Pathology**, v.131, p.383-392, 2011.

ROSSI, R.L.; REIS, E.M.; BRUSTOLIN, R. Morfologia de conídios e patogenicidade de isolados de *Exserohilum turcicum* da Argentina e do Brasil em milho. **Summa Phytopathol**, Botucatu, v.41, n.1, p.58-63, 2015.

SANTOS, G.R.; CAFÉ-FILHO, A.C.; LEÃO, F.F.; CÉSAR, M.; FERNANDES, L.E. Progresso do crestamento gomoso e perdas na cultura da melancia. **Horticultura**

Brasileira, v. 23, n. 2, p. 228-232, 2005.

SARMENTO-BRUM, R.B.C.; CASTRO, H.G.; SILVA, M.L.; SARMENTO, R.A.; NASCIMENTO, I.R., SANTOS, G.R. Effect of plant oils in inhibiting the mycelial growth of pathogenic fungi. . **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.5, n.1, p. 63-70, 2014.

SCAPIN, C.R.; CARNELOSSI, P.R.; VIEIRA, R.A.; SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; CRUZ, M.E.S. **Fungitoxidade *in vitro* de extratos vegetais sobre *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.12, n.1, p.57-61, 2010.

SCHEFFER, R. P.; LIVINGSTON, R. S. Host-selective toxins and their role in plant diseases. **Science**, v. 223, p. 17-21,1984.

SHANER, G. & FINNEY, R.E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing resistance in knox wheat. **Phytopathology**, v.67, n,8, p.1051-1056, 1977.