



ANA CLARA COSTA GONÇALVES

**TRANSMISSÃO DE *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* E
Fusarium subglutinans POR SEMENTES DE MILHO**

LAVRAS – MG

2020

ANA CLARA COSTA GONÇALVES

**TRANSMISSÃO DE *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* E *Fusarium subglutinans* POR
SEMENTES DE MILHO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia para a obtenção do título de Bacharel.

Orientador
Prof. Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG
2020**

ANA CLARA COSTA GONÇALVES

**TRANSMISSÃO DE *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* E *Fusarium subglutinans* POR
SEMENTES DE MILHO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Agronomia para a obtenção do título de Bacharel.

APROVADA em 18 de agosto de 2020.

Dra. Carolina da Silva Siqueira UFLA

Dra. Iara Eleutéria Dias UFLA

Orientador

Prof. Dr. José da Cruz Machado

**LAVRAS - MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar o meu caminho, me dar forças nos momentos de dificuldade e colocar as melhores pessoas na minha vida e ao meu lado nessa jornada. Aos meus pais, Gilcilene e Paulinho, obrigada por todo o suporte, educação, carinho, amor incondicional e por sempre acreditarem em mim, dedico essa vitória a vocês. Ao meu irmão João Paulo, agradeço por toda a proteção e amizade. E a minha avó Carmélia, por todo carinho e orações.

A toda minha família, tios, primos, madrinha e padrinho, obrigada pela torcida e confiança. Ao meu namorado Gabriel, por sempre me apoiar e me inspirar.

A todos os amigos de Três Corações e Lavras, em especial a Larissa, Lisa, Júlia, Thiago, Maria Paula, Luísa, Rafaela, Isa, Gabi, Ana Luísa e Amanda. Vocês fizeram parte de toda essa jornada e foram fontes de alegria e suporte durante essa etapa.

Ao meu orientador José da Cruz Machado, agradeço pela paciência e pelos ensinamentos. A minha coorientadora e amiga Carol, obrigada pelas risadas, bons momentos, paciência e amizade. Agradeço também a Iarinha, pela amizade e por aceitar fazer parte da minha banca.

A todos os meus amigos do Laboratório de Patologia de Sementes, aos que já foram embora e aos que estão presentes, em especial Anny, Paulo, Lucas, Rodrigo, Bárbara, Marina, Sueny, Poly, Lêlê, Stélio, Layza e Fabiana. Foi um prazer trabalhar e conviver com todos vocês desde 2015.

A República Carpe Diem, obrigada pelas amizades e aprendizados. As +qdivas, agradeço por todos os anos de companheirismo.

A fazenda Bartletts Farm, onde tive a oportunidade de fazer o intercâmbio de estágio, sou grata pelo crescimento profissional e pessoal adquirido. A todos os amigos que conheci durante o intercâmbio, nunca esquecerei vocês.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa história e ajudaram a construir quem eu sou hoje, vocês foram essenciais. Muito obrigada.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	8
2.1 Cultura do milho.....	8
2.2 Características gerais de <i>Fusarium verticillioides</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> e <i>Fusarium subglutinans</i>	9
2.3 Doenças causadas por <i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i> e <i>F. subglutinans</i> em milho	10
2.4 Ciclo de transmissão de patógenos em relação a sementes em milho	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Origem e multiplicação dos isolados fúngicos e perfil das sementes utilizadas	13
3.2 Inoculação das Sementes	13
3.3 Teste de sanidade.....	14
3.4 Avaliação da transmissão dos fungos em condições de cultivo controlado	14
3.5 Delineamento experimental.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	15
5 CONCLUSÕES	21
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21

RESUMO

O milho é um dos principais cereais usados na alimentação humana e animal no mundo. A produção do milho pode ser afetada negativamente por inúmeros fatores entre os quais estão as doenças causadas por fungos. Dentre estas doenças, estão a podridão rosada da espiga e a fusariose, causadas pelas espécies, *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, que além de trazerem prejuízos para a produção, também, estão diretamente ligados a má qualidade de grãos e sementes, devido a formação de 'grãos ardidos'. Sementes contaminadas podem disseminar ou introduzir estes patógenos em campos de cultivo, tornando-se importante o conhecimento de todo o processo de transmissão desde a semente até a planta de milho. Portanto, o objetivo do trabalho foi determinar as taxas de transmissão de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, a partir de diferentes potenciais de inóculo, de sementes para plantas de milho, sob diferentes temperaturas em condições de cultivo controlado. A inoculação das sementes foi realizada pelo método de condicionamento hídrico, por 36 (potencial de inóculo 1 - P1), 72 (P2), 108 (P3) e 144 (P4) horas. Em câmaras de cultivo vegetal com temperaturas ajustadas à 20 °C e à 26 °C, foram distribuídas 25 sementes inoculadas, individualmente, em copos plásticos contendo substrato, com 4 repetições por tratamento. Ao final de 28 dias de avaliações diárias, todas as plantas foram analisadas por métodos biológicos. A morte em pré-emergência de sementes de milho inoculadas com *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* é uma das consequências da associação destes fungos com as sementes. Plantas com infecção assintomática originadas das sementes inoculadas se desenvolvem com possível infecção latente, aguardando majoritariamente condições favoráveis para o desenvolvimento dos patógenos. As máximas taxas de transmissão total de sementes para plantas de milho, em condições favoráveis, são de 98% para *F. verticillioides*, 95% para *F. proliferatum* e de 88% para *F. subglutinans*.

Palavras-chave: Podridão rosada da espiga, Patologia de sementes e fungos.

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) possui grande importância econômica pelas suas variadas formas de utilização, que vão desde a alimentação animal até a indústria para diversos fins (PAES, 2006).

A produção do milho pode ser afetada negativamente por inúmeros fatores entre os quais estão as doenças causadas por fungos, que podem comprometer de maneira significativa o potencial de rendimento da cultura (WHITE, 1999). A expansão da área cultivada em plantio direto proporcionou uma alteração no microclima e no equilíbrio do agroecossistema, com reflexos nas populações dos agentes causais das doenças do milho (REIS et al., 2004).

A presença dos restos culturais sobre a superfície do solo beneficia a sobrevivência de muitos fitopatógenos, fazendo com que doenças tradicionais ocorram com maior intensidade e que novas doenças se manifestem. A importância de cada uma dessas doenças é variável de ano para ano e de região para região. Dentre os patógenos que causam doenças no milho, estão os fungos *Fusarium verticillioides* (sin. *F. moniliforme*), *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (complexo *Gibberella fujikuroi*, segundo O'Donnell et al., 1998), causadores da podridão rosada da espiga, podridão de *fusarium* ou fusariose, que além de trazerem prejuízos para a produção, também, estão diretamente ligados a má qualidade de grãos e sementes, devido a formação de 'grãos ardidos', que apresentam baixa germinação e contém micotoxinas de alto risco para o consumo humano e animal (COSTA et al., 2010; PINTO, 2006).

As principais fontes de inóculo das espécies de *Fusarium* em áreas de cultivo são os restos de cultura de milho, como colmos e espigas, as sementes de milho contaminadas, as gramíneas de inverno (trigo, aveia e cevada) e, também, o solo. A disseminação dos esporos se dá através do vento e de insetos, e o período de maior suscetibilidade ocorre de 7 a 10 dias após a polinização dos estigmas. Em relação aos sintomas pode ocorrer uma pigmentação rosa entre os grãos/sementes, sendo que as espigas que não ficam na posição adequada após a maturidade fisiológica e aquelas com empalhamento deficiente são as mais suscetíveis. Como padrão de qualidade, tem-se adotado no comércio do milho um nível de tolerância máxima de grãos ardidos de 6%. Em períodos de fortes chuvas após o estágio da maturidade fisiológica dos grãos/sementes e, pela postergação da época de colheita do milho, a incidência de grãos ardidos supera normalmente este padrão de tolerância. Contudo, um dos principais agravantes da presença desses patógenos em grãos e sementes de milho, é que esses fungos são biossintetizadores eficazes de toxinas, denominadas micotoxinas, muito prejudiciais à saúde humana e animal (DUCAN & HOWARD, 2009; MUNKVOLD, 2003; PINTO, 2006; WILKE et al., 2007).

Apesar das sementes não serem a única forma de disseminação desses patógenos, estes podem ser introduzidos em novas áreas de cultivo através de sementes contaminadas, mesmo distantes de seu local de produção, constituindo-se, assim, fontes de inóculo primário para podridão das sementes, morte de plântulas e podridão de raízes.

As condições de armazenamento das sementes infectadas por espécies de *Fusarium* nem sempre propiciam a eliminação ou redução destes organismos até a fase de germinação das sementes no solo. A partir da semeadura a concretização do processo de transmissão dos patógenos das sementes às plantas emergentes assume um papel ainda mais preocupante, tendo em vista o papel de disseminação de inoculo que se estabelece no campo de cultivo (CASELA et al., 2006). Desse modo, entender os mecanismos de transmissão neste tipo de interação é uma necessidade fundamental para o estabelecimento de padrões de tolerância dentro do processo de certificação de sementes. Para *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* que ainda não foram enquadrados como pragas não quarentenárias regulamentadas, não se dispõe de padrões de tolerância da incidência dos mesmos em amostras de sementes (BRASIL, 2009b).

O objetivo deste trabalho foi determinar as taxas de transmissão de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, a partir de diferentes potenciais de inóculo, de sementes para plantas de milho, sob diferentes temperaturas em condições de cultivo controlado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Cultura do milho

A cultura do milho tem uma grande importância socioeconômica no Brasil, por fornecer produtos amplamente usados na alimentação humana e animal e na Indústria para diversas outras finalidades além de sua participação relevante na pauta de exportação a diversos países do mundo. Os estados de Mato Grosso, Paraná, Mato Grosso do Sul, Goiás, Minas Gerais e Rio Grande do Sul são os maiores produtores (CONAB, 2019).

No Brasil, o milho é o segundo grão mais produzido, ao lado da soja, chegando a uma produção média de 80.709,5 milhões de toneladas, na primeira e segunda safra de 2018/19 (CONAB, 2019). A produção de sementes de milho no Brasil, na safra de 2017/2018 foi de 562.955 toneladas (ABRASEM 2018). Com o avanço de tecnologias a estimativa de cultivo do milho na primeira safra, na temporada 2019/20, é de 4,25 milhões de hectares, 3,4% maior que a área cultivada na safra 2018/19. A produção deverá apresentar crescimento de 0,4% em comparação a 2018/19, e resultar em uma produção de 100,5 milhões de toneladas (CONAB, 2020).

Apesar do avanço na tecnologia, tem sido observado um aumento nas doenças em milho, possivelmente associado ao avanço das áreas cultivadas, juntamente com o crescimento da monocultura, o uso inadequado da irrigação e pela formação de campos homogêneos, tais aspectos propiciam microclimas favoráveis ao desenvolvimento de patógenos. Tais doenças vêm surgindo e tornando-se mais severas, chegando a causar perda na qualidade dos grãos, como também, na produtividade, gerando assim prejuízos econômicos (PEREIRA et al., 2005; LANZA et al., 2016).

Dentre várias doenças que acometem a cultura de milho, espécies de *Fusarium* se destacam como importantes causadores de podridões radiculares, morte de plântulas, podridões de espiga e de colmo (MULKVOLD, 2003).

2.2 Características gerais de *Fusarium verticillioides*, *Fusarium proliferatum* e *Fusarium subglutinans*

O gênero *Fusarium*, de acordo com a classificação taxonômica, constitui um estado anamorfo da ordem Hypocreales, filo Ascomycota. Dentro desse gênero, as espécies *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg, *Fusarium proliferatum* (Matsushima) Nirenberg e *Fusarium subglutinans* (Wollenweber) & Reinking, compõem um grupo de aproximadamente 20 espécies que pertencem ao complexo *Gibberella fujikuroi* (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

O referido gênero engloba espécies de fungos filamentosos presentes no solo e em partes aéreas de plantas. Algumas destas espécies produzem toxinas que podem afetar o homem e os animais. Das mais de 100 espécies de *Fusarium* descritas, apenas 12 delas podem ser consideradas patogênicas aos seres humanos, incluindo *F. verticilloides* (TAPIA; AMARO, 2014).

O *F. verticillioides* é um patógeno que produz microconídios em cadeias longas, clavados com a maioria unicelular, clamidósporos ausentes e macroconídios falcados, com 3 a 5 septos, colônias com coloração violeta em meio BDA e formação de esporodóquios de coloração alaranjada. Formam peritécios negros, produzidos de forma heterotática e ascósporos fusiformes, a maioria com um septo (LESLIE; SUMMERELL, 2006).

F. proliferatum é uma espécie da *mating population D* (Membros do acasalamento da população D). Os microconídios são formados em cadeias curtas e, menos frequentemente, em falsas cabeças em monofiálides e polifiálides. Os macroconídios são falcados, quase retos, com 3 a 5 septos, e encontrados em esporodóquios de coloração alaranjada. Assim como as espécies do complexo *G. fujikuroi*, não produz clamidósporos (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

F. subglutinans possui macroconídios curvos, com 3 a 7 septos, medindo de 2,4-4,9 x 15-60 µm, são produzidos em falsas cabeças, mas nunca em cadeia. Os microconídios são abundantes, medindo de 2-3 x 5-12 µm, e produzidos em cadeia ou em falsas cabeças no micélio. Os peritécios, raramente encontrados na natureza, produzem ascas com dimensões de 75-100 x 10-16 µm, que contêm 8 ascósporos retos, a maioria com 1 septo, medindo de 4,5-7,0 x 12-17 µm (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

As características com valor taxonômicas usadas para separar espécies dentro do complexo *G. fujikuroi* são o tipo de célula conidiogênica que suporta o microconídio e a disposição destes esporos sobre as mesmas (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

As características morfológicas de tais fungos não são suficientes e quando usadas como único critério, podem ocasionar em erros. Isso acontece devido a grande plasticidade e similaridade dos marcadores morfológicos entre as espécies, o que torna necessário o uso de técnicas complementares como

métodos moleculares e cruzamentos, para as espécies que tem fase sexuada e o uso de protocolos baseados em PCR, que utilizam primers específicos para a identificação desses fungos (LESLIE; SUMMEREL, 2006).

2.3 Doenças causadas por *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* em milho

O fungo *F. verticillioides* é um importante causador de podridões radiculares, morte de plântulas, podridões de espiga e de colmo do milho (MULKVOLD, 2003). A principal doença causada por *F. verticillioides* é a podridão rosada da espiga, que também pode ser causada por *F. proliferatum* e *F. subglutinans* (SILVA, 2001). Uma das consequências das podridões em espigas são os grãos ardidos, que são um dos principais problemas de qualidade do milho, devido à possibilidade da presença de toxinas, como as fumonisinas. São considerados grãos ardidos todos aqueles que possuem pelo menos um quarto de sua superfície com descolorações, cuja matiz pode variar de marrom claro a roxo (PINTO, 2005). As perdas por qualidade por grãos ardidos são motivo de desvalorização do produto e riscos à saúde humana (PINTO, 2001). Essa doença está relacionada a injúrias causadas por insetos ou pássaros. Os grãos infectados adquirem coloração avermelhada e com o avanço da doença podem adquirir uma camada cotonosa rosada espiga. A infecção pode se iniciar por qualquer parte da espiga e é muito favorecida pelo excesso de chuva. O controle para essa podridão é o uso de cultivares que apresentam espigas de milhos bem empalhadas, com palhas bem aderidas e decumbentes, que impedem a penetração da água da chuva e dos esporos dos fungos. *F. verticillioides* é o fungo mais frequente em grãos de milho recém-colhidos, com níveis de contaminação de até 100% (SILVA, 2001).

Em trabalho realizado por Machado e colaboradores (2013), o *F. verticillioides* em sementes com diferentes potenciais de inóculo, se mostrou muito prejudicial ao desenvolvimento inicial da planta de milho. E de acordo com o aumento do potencial de inóculo nas sementes, o número da população de plantas no experimento diminuiu e os danos no sistema radicular aumentaram. Esse fungo causa doenças em todas as fases da planta, tanto nas raízes, como no colmo e nos grãos. Além de perda de qualidade da lavoura, esse fungo pode causar risco à saúde humana e animal, devido à produção da toxina fumonisina (ONO; HIROOKA, 2003).

O *F. proliferatum*, também, é um patógeno da podridão do milho e pode produzir as micotoxinas em condições de campo e de armazenamento. Esse fungo pode ter uma frequência de ocorrência igual ou superior a 90% no milho e pode causar podridão em arroz e em algumas frutas. Pode ser patógeno por muitos anos, pois consegue sobreviver em restos culturais (BACON; NELSON, 1994).

Outra doença importante é a podridão de *fusarium*, que pode ser causada por *F. verticillioides* e *F. subglutinans*. Também, relacionada a injúrias, essa doença apresenta uma alteração de cor dos grãos infectados, que varia do róseo ao marrom escuro e estrias de coloração branca no pericarpo. Além disso, é observado um crescimento cotonoso de coloração clara a avermelhada, que equivale ao micélio do fungo. A infecção pode ser pelo topo ou pelo pedúnculo da espiga. O crescimento dos patógenos nas espigas é

interrompido quando o teor de umidade dos grãos atinge 18% a 19% (SILVA, 2001). O colmo e as raízes, também podem ser infectados. Os tecidos internos dos entrenós e das raízes adquirem coloração avermelhada que evolui de forma uniforme da base a parte superior da planta. Geralmente, a podridão de colmo causada por *Fusarium*, está relacionada ao ataque de nematoides ou pragas subterrâneas, que causam ferimentos nas raízes, ajudando na entrada no fungo (FERNANDES; OLIVEIRA, 2000). No trabalho realizado por Angelotti (2013), os fungos *F. subglutinans* apresentou 10% de raízes necrosas em plântulas de milho.

Além disso, esses fungos podem produzir micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos pelos fungos e liberados pelo seu metabolismo e essas micotoxinas podem continuar no alimento mesmo depois de eliminado o fungo. Os principais efeitos desses metabólitos tóxicos são em longo prazo, acumulados no organismo, tanto de humanos como de animais. Dentre os tipos de controle para esses fungos, químicos e físicos, o controle que tem o menor custo e causa menores danos ao meio ambiente é o biocontrole (GASPERINI, 2011).

O ambiente ideal, para esses fungos, inclui temperaturas próximas a 30°C e altitudes menores que 700 metros. A época de plantio, com altas temperaturas e ambiente seco, seguido de longos períodos de chuva no florescimento, ajuda no crescimento desses fungos nas culturas. Eles têm facilidade de sobreviver em restos de vegetais, como na palhada de milho, e se disseminam por ventos e chuvas (SILVA, 2001). Apesar de tais fungos serem muitas vezes isolados das sementes, estas não são a principal fonte de inóculo. Como possuem a fase saprofítica ativa, sobrevivem e se multiplicam na matéria orgânica, no solo, sendo esta a fonte principal de inóculo. Alguns estudos relatam que em condições ambientais favoráveis a esses fungos e em cultivares suscetíveis, a incidência de podridão do colmo pode chegar a 70%, causando danos de até 50% de perda em produtividade (EMBRAPA, 2006).

2.4 Ciclo de transmissão de patógenos em relação a sementes em milho

A transmissão no âmbito da Patologia de Sementes é a passagem dos fitopatógenos que infectam as sementes, para os órgãos aéreos fotossintetizantes e/ou raízes. A passagem do inóculo de patógenos a partir de planta infectada para as sementes formadas nesta mesma planta constitui também um outro processo de transmissão. Estes processos são importantes, pois garantem o ciclo de vida dos patógenos, ao assegurarem a sua fonte nutricional, constituído principalmente de órgãos verdes, que são necessários ao crescimento e esporulação dos patógenos. A semente tem um papel muito importante na disseminação desses patógenos, já que permite que os mesmos percorram distâncias consideráveis no processo de comercialização e consigam completar seu ciclo (REIS et al., 2014).

Para o fungo a transmissão de sementes para plantas é fundamental em lavouras onde o milho nunca foi semeado ou em áreas de rotação de culturas, pois indica o potencial de inóculo da semente no desenvolvimento inicial de epidemias (CASA et al., 2006)

Os mecanismos de transmissão usados pelos patógenos a partir de sementes são variados e dependem da sua localização na semente. O inóculo pode estar presente em mistura com as sementes, aderido ou no interior destas. Além dos mecanismos de transmissão da semente até a planta, existem dois outros mecanismos possíveis de estabelecimento do patógeno transmitida da planta até o interior das sementes: através do sistema vascular de plantas atacadas e através de órgãos fertilizadores, como grão de pólen, contaminados ou infectados. No caso da contaminação de sementes por patógenos, esta é geralmente concluída pela mistura mecânica do inóculo pela manipulação de plantas durante a colheita (MACHADO, 1988).

F. verticillioides pode infectar a planta de diversas formas. Na associação com o milho é um exemplo de microrganismo endofítico facultativo, que pode existir tanto na forma biotrófica, quando necessita da planta viva, quanto na forma saprofítica, onde sobrevive em tecidos mortos, como restos culturais (PINTO, 2005; SAMSUDIN; MAGAN, 2015). A semente é fonte de inóculo primário para *F. verticillioides* e a taxa de transmissão é influenciada pela temperatura do solo (NERBASS, 2008). De acordo com resultados do trabalho de SARTORI e colaboradores (2004), o *F. verticillioides* pode a partir de sementes de milho naturalmente infectadas ser transmitido para diferentes órgãos da planta até 45 dias após a semeadura. Nesse mesmo trabalho, observou-se resultados de taxa de transmissão do *F. verticillioides* para 15, 30 e 45 dias após a semeadura. A média foi de 46,1% de transmissão para o tegumento remanescente da semente, 34,9% para raiz primária, 23,6% para entrenó subcoronal, 7,2% para coleóptilo e 14,6 % para a base das folhas.

O fungo *Fusarium proliferatum* é frequentemente encontrado em sementes de milho, ou seja, uma fonte de inóculo importante no campo (COTTEN; MUNKVOLD, 1998; POSTIC et al., 2012). O ciclo de vida de *F. proliferatum* transmitidos por sementes não foi totalmente estudado, mas suspeita-se que ele seja bastante semelhante ao *F. verticillioides* (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997; BATTILANI; ROSSI, 2003). Em um estudo realizado por Nguyen e colaboradores (2016), foi visto a infecção subcuticular de *F. proliferatum* em folhas de milho sintomáticas e sem sintomas. O *F. proliferatum* penetrou nos estômatos das folhas imaturas e as hifas produziram microconídios dentro dos tecidos foliares que esporulavam através de estômatos e tricomas.

O fungo *F. subglutinans* é um fungo necrotrófico de acordo com Viljoen e colaboradores (1997). Esse tipo de fungo infecta a planta hospedeira penetrando diretamente nos tecidos da planta (CARLILE et al., 2001). Em estudo realizado por Widyastuti e colaboradores (2014) as hifas do *F. subglutinans* conseguem penetrar no tecido da planta através dos estômatos. Há uma escassez de estudos sobre a transmissão de sementes contaminadas com *F. subglutinans* para plantas.

A transmissão do patógeno pela semente é influenciada por vários fatores, como espécie cultivada, condições ambientais, práticas culturais, sobrevivência do inóculo, vigor da semente, microflora do solo outros. Estes fatores podem diminuir ou aumentar a passagem do patógeno para os órgãos aéreos, ou radiculares da planta (AGARWAL; SINCLAIR, 1997). A quantificação de taxa de transmissão é de extrema

importância para esclarecer o potencial epidemiológico de sementes. Quanto maior a incidência do fungo na semente, maior será a eficiência da transmissão (CASA et al., 2004; 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi conduzido no Laboratório de Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

3.1 Origem e multiplicação dos isolados fúngicos e perfil das sementes utilizadas

Os isolados de *F. proliferatum* (CML704) e de *F. subglutans* (CML893) foram obtidos junto à Coleção Micológica de Lavras (CML) e um isolado de *F. verticillioides* (CMLAPS355) pertence à Coleção Micológica do Laboratório de Patologia de Sementes da UFLA. Todos isolados foram multiplicados em meio BDA (20 g de ágar, 20 g de dextrose e extrato de 200 g de batata/litro) contido em placas de Petri de 10 cm de diâmetro, com incubação em câmara BOD com temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. As sementes de milho foram fornecidas pela Empresa Riber Sementes (Patos de Minas, MG) e apresentavam germinação de 98% e pureza física mínima de 99% e livres de agentes fitopatogênicos.

3.2 Inoculação das Sementes

Para a inoculação das sementes com as três espécies de *Fusarium*, foi utilizada a metodologia de condicionamento hídrico, descrita na literatura (COSTA et al., 2003; MACHADO et al., 2012). O procedimento constou de desinfestação inicial das sementes por meio de hipoclorito de sódio 1%, por 1 minuto, seguida de tríplice lavagem com água destilada e seca em ambiente de laboratório. Os isolados selecionados foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultura BDA acrescido do soluto manitol, com potencial hídrico ajustado a -1,4 MPa (MICHEL & RADCLIFFE, 1995) e cultivados por 5 dias. Sobre as colônias fúngicas foram distribuídas as sementes em camadas simples e as placas mantidas em câmaras do tipo BOD, com temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas. Os períodos de incubação foram de 36, 72, 108 e 144 horas, que corresponderam aos potenciais de inóculo P1, P2, P3 e P4 respectivamente. Para checagem de possíveis efeitos isolados do restritor hídrico na qualidade das sementes de milho, da mesma cultivar selecionada para este trabalho, utilizou-se os mesmos procedimentos empregados para inoculação das sementes. Todas as sementes foram secas, em temperatura ambiente, por 48 horas.

3.3 Teste de sanidade

Para o cálculo das taxas de transmissão dos fungos em foco foram realizados testes de sanidade, blotter teste, com o intuito de indicar a incidência inicial de ocorrência de cada fungo nas porções de sementes representativas de cada potencial de inóculo. Por este teste, as sementes foram distribuídas sobre substrato de papel de filtro (três discos sobrepostos) embebido em meio ágar-água (1% de agar), em placas de Petri com 15 cm de diâmetro, sendo utilizadas 8 repetições de 25 sementes por placa. Após 24 horas as sementes foram colocadas em freezer, a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, pelas próximas 24 horas e posteriormente mantidas, por sete dias, em câmara de incubação com temperatura de $20\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Ao final desse período, as sementes foram examinadas individualmente utilizando-se microscópio estereoscópico, para verificação da incidência das espécies em estudo.

3.4 Avaliação da transmissão dos fungos em condições de cultivo controlado

Para este ensaio o plantio foi feito distribuindo as sementes em substrato constituído de uma mistura de substrato comercial (Multiplanta trop), areia e solo, na proporção de 1:1:1, em copos plásticos de 200 ml, uma semente por copo e utilizando-se 100 copos igualmente dispostos em quatro bandejas (1 bandeja/repetição). O experimento foi conduzido em câmaras de crescimento vegetal com temperaturas ajustadas a $20\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e a $26\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas luz (luz do dia NSK T10 40W 6500K FL40T10-6 60Hz)/12 horas escuro. As avaliações foram realizadas contando se diariamente, o número de sementes/plântulas mortas em pré-emergência e a emergência de plantas sintomáticas e assintomáticas. Trinta dias após a semeadura (d.a.s) todas as plantas assintomáticas foram coletadas e seccionadas em fragmentos de 2 cm de extensão na região do colo (C) e da última inserção das folhas (IF) (Figura 1). Estes fragmentos foram primeiramente desinfestados utilizando a sequência de álcool 70%, hipoclorito de sódio 1% e lavagem por três vezes com água destilada e esterilizada, cada etapa com duração de por 30 segundos, e, posteriormente, secos em papel esterilizado. Todos os fragmentos foram depositados em placas de Petri com o meio BDA e incubados, à temperatura de $26\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas. Após 7 dias, os fragmentos foram examinados individualmente no microscópio estereoscópico, para a observação de estruturas características das espécies de *Fusarium* estudadas.

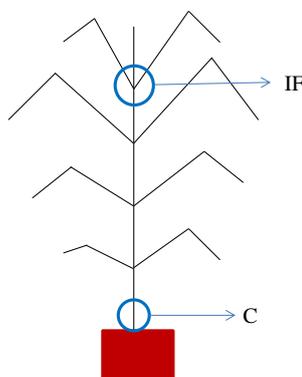


Figura 1. Desenho esquemático das regiões na planta de milho de onde foram retirados os fragmentos para avaliação da presença de *Fusarium*, sendo estes, o colo (C) e a última inserção de folhas (IF).

A ocorrência dos patógenos alvos em pelo menos um dos fragmentos das plantas examinadas foi suficiente para a confirmação da transmissão dos patógenos da semente para a planta.

A taxa de transmissão de cada fungo em estudo foi calculada considerando-se o somatório do seu percentual de ocorrência em sementes/plântulas mortas em pré-emergência, percentual de ocorrência nas plantas emergidas com sintomas e plantas emergidas assintomáticas (SIQUEIRA et al., 2014; 2016).

3.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi em blocos ao acaso, por espécie de fungo, com cultivo em 2 temperaturas, com 4 potenciais de inóculo e quatro repetições por tratamento.

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa Sisvar[®] versão 5.3 (FERREIRA, 2011). As análises de variância foram realizadas separadamente por espécie de *Fusarium*. As médias entre os tratamentos foram comparadas por teste Tukey ($P \leq 0,05$). Para a taxa de transmissão total, consideraram-se os percentuais das taxas de transmissão de plantas assintomáticas e mortes em pré-emergência de sementes/plântulas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para as variáveis avaliadas como: morte de sementes/plântulas em pré-emergência e as taxas de transmissão de sementes para plantas, sendo as sementes inoculadas com *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutans*, para obtenção de diferentes potenciais de inóculo, a análise de variância revelou interação significativa para cada espécie dos fungos ($p \leq 0,05$).

Avaliações iniciais realizadas para checar a interferência do restritor hídrico no desempenho das sementes na ausência dos patógenos, mostraram que não houve efeito negativo do restritor em nenhum dos períodos de contato das sementes com o substrato contendo apenas o restritor.

Pelas contagens diárias de estandes de plantas emergidas e não emergidas, realizadas até o final das avaliações neste trabalho, Figura 2, observou-se que o percentual de mortes de sementes e plântulas em pré-emergência foi crescente em relação aos aumentos de potenciais de inóculo adotados, porém os efeitos mais drásticos foram registrados no maior potencial de inóculo P4 para todas as três espécies de *Fusarium*. O gradiente de aumento destes efeitos foi menos acentuado entre os dois potenciais de inóculo mais baixos. Em relação aos efeitos de temperatura do ambiente de cultivo no comportamento das três espécies de *Fusarium* em estudo, os danos na fase inicial de desenvolvimento do milho foram em média mais acentuados na temperatura de 26 °C. Chama atenção o maior grau de agressividade das espécies *F. verticillioides* e *F. subglutinans* em ambas as temperaturas de cultivo. De modo geral *F. verticillioides* foi a espécie mais

prejudicial à germinação das sementes de milho neste estudo. Estes resultados confirmam informações de outros trabalhos nesta mesma linha de pesquisa (SIQUEIRA et al., 2014; 2016).

Pontualmente *F. verticillioides* provocou mortes de sementes de milho na fase pré-emergente em níveis de 45% no potencial de inóculo P3 a temperatura de 26 °C, chegando a 77 % e 95% em sementes com potencial de P4, em cultivos a 20 e 26 °C, respectivamente (Figura 2A). Já *F. proliferatum*, também, foi detectado colonizando sementes não emergidas, porém em menores porcentagens, chegando ao máximo de 70%, no maior potencial, P4, em ambiente com temperatura de 26 °C (Figura 2B). Com comportamento semelhante ao de *F. verticillioides*, mas com porcentagens mais baixas, *F. subglutinans* infectou sementes e plântulas cultivadas a 26 °C, chegando ao máximo de 68% de sementes com morte em pré-emergência com o potencial de inóculo de P3, seguidos de 86% com potencial de P4, para a mesma temperatura (Figura 2C). A menor taxa de morte em pré-emergência foi registrada em sementes inoculadas com *F. proliferatum*, com o valor médio de 1% no menor potencial P1 à temperatura de 20 °C.

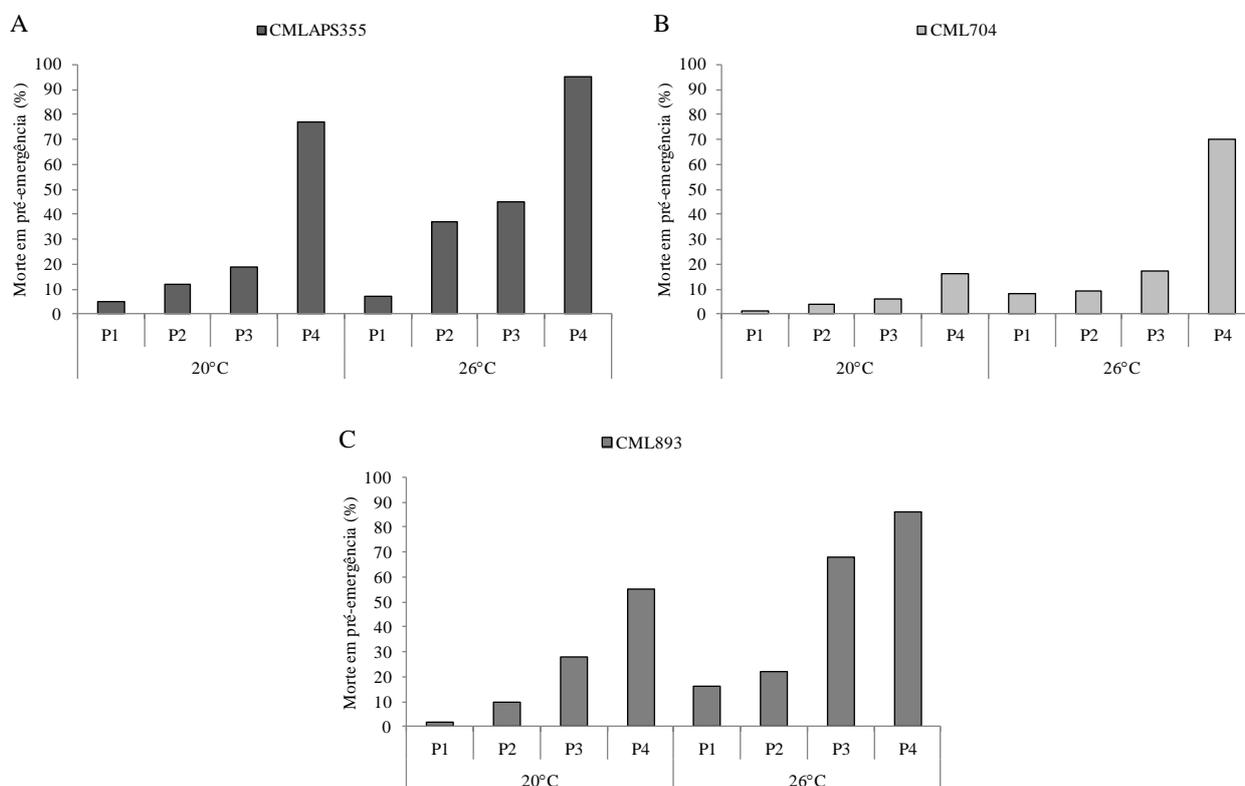


Figura 2. Valores percentuais de morte de sementes/plântulas em pré-emergência, causada pelos fungos A- *F. verticillioides* (CMLAPS355), B- *F. proliferatum* (CML704) e C- *F. subglutinans* (CML893) nos potenciais de inóculo P1 (36 horas), P2 (72h), P3 (108h) e P4 (144h), em sementes de milho com cultivos a temperaturas de 20 °C e 26 °C.

Nas plantas emergidas ao longo dos 30 dias de cultivo, foi possível observar poucos casos de transmissão com infecção sintomática, sendo estes sintomas apenas na forma de senescência ou amarelecimento das folhas, com nenhuma ocorrência de podridões características das espécies de *Fusarium*,

entretanto estes dados não foram significativos. Provavelmente, isso esteja correlacionado com o fato de *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* serem mais associados, em algumas regiões, a doenças de fim de ciclo da cultura, como lesões concentradas nas espigas, ou podridões de espigas (MACHADO et al., 2014).

Inúmeras plantas, principalmente originadas de sementes com baixos potenciais de inóculo, mantiveram-se assintomáticas até o final do cultivo, porém testaram positivas quanto à presença dos fungos em estudo. As taxas de transmissão dos fungos nas plantas assintomáticas foram altas, levando-se em consideração a presença dos fungos em qualquer uma das partes seccionadas das plantas incubadas em meio de cultura (Figura 3 e 4). As maiores porcentagens foram verificadas nos potenciais P1 e P2, isso devido ao maior número de plantas que conseguiram emergir e se desenvolver nestes potenciais.

Plantas emergidas oriundas de sementes inoculadas com *F. verticillioides*, com potencial de inóculo P1 e cultivadas a 20 °C, apresentaram taxas de transmissão com infecção assintomática de 77% (Figura 3A), já com plantas cultivadas a 26 °C, o percentual chegou a 71%. *F. proliferatum* demonstrou que, encontrando condições favoráveis ao seu estabelecimento, permanece nas plantas sem necessariamente causar a morte em pré-emergência, ou desenvolver sintomas. As taxas observadas para plantas com infecção assintomática de *F. proliferatum* com potencial P1 e P2, cultivadas à 20 °C, atingiram 81 e 87%, respectivamente, sendo em plantas com P3 cultivadas a 26 °C, a taxa foi de 78% (Figura 3B). No entanto, Para sementes inoculadas com *F. subglutinans*, a taxa máxima alcançada foi de 70%, sendo a espécie com as menores taxas máximas observadas (Figura 3C).

Padrão diferente destes resultados observados com as espécies de *Fusarium* ocorreu com trabalho realizado com *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de girassol, onde não foi registrada a transmissão do agente patogênico às plantas assintomáticas. Isto foi demonstrado pelos procedimentos convencionais de isolamento e confirmado pela incubação de fragmentos das plantas sobre meio semi-seletivo de ágar e bromofenol (Neon), que resultou na ausência do fungo em qualquer uma das partes avaliadas das plantas de girassol sem sintomas (ZANCAN et al., 2015).

No caso das espécies de *Fusarium* serem detectadas em plantas assintomáticas originadas de sementes inoculadas, presume-se que os patógenos podem permanecer nos tecidos da planta, de forma endofítica por grande parte do ciclo do hospedeiro. Na medida em que as plantas atingem a maturidade no campo estas espécies de *Fusarium* encontram condições favoráveis para atingirem as partes reprodutivas como as espigas e assim causando a formação de grãos ardidos e podridões de espigas (NEERGAARD, 1979).

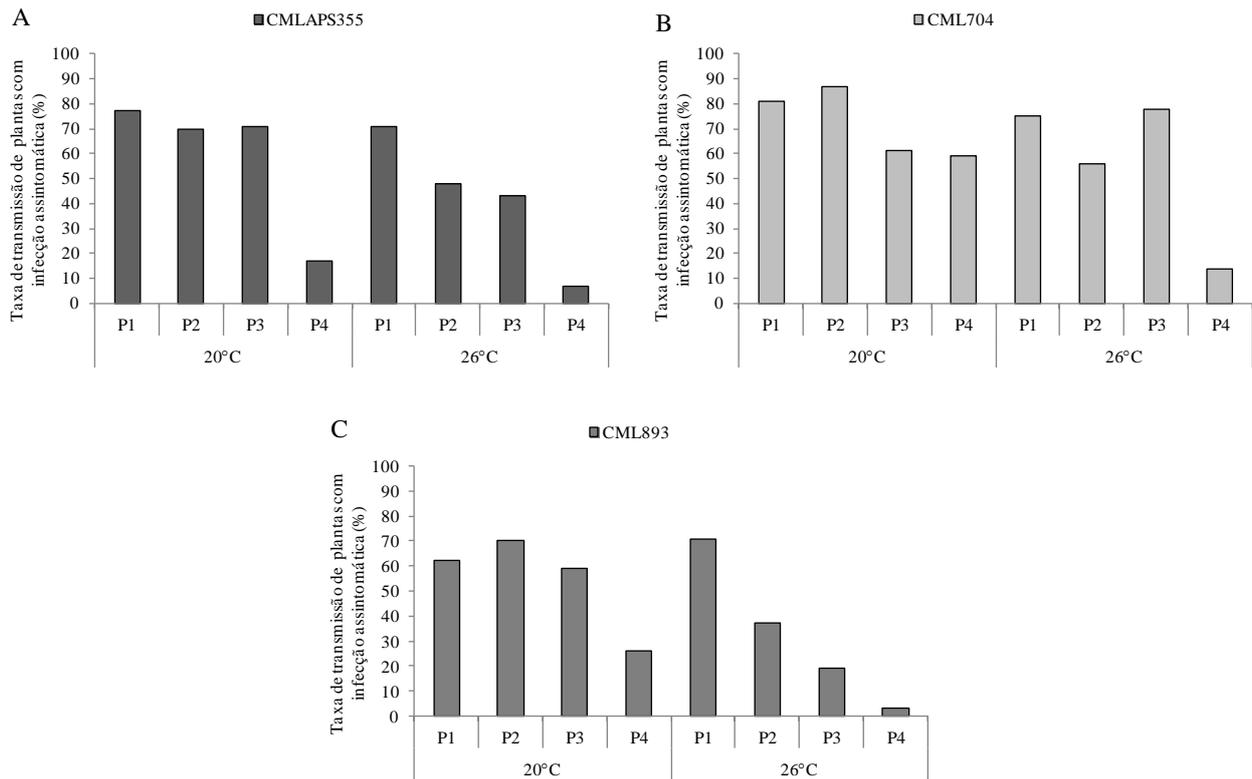


Figura 3. Taxa de transmissão de A- *F. verticillioides* (CMLAPS355), B- *F. proliferatum* (CML704) e C- *F. subglutinans* (CML893) em plantas com infecção assintomática, originadas de sementes inoculadas, com quatro potenciais de inóculo (P1-36 horas, P2-72h, P3-108h e P4-144h) e cultivadas nas temperaturas de 20 °C e 26 °C.

Outro aspecto avaliado neste estudo foi a localização dos patógenos em partes das plantas com infecção assintomática (Figura 4 e 5). Sabe-se que as espécies de *Fusarium* se estabelecem em restos culturais e solo (CASELA et al., 2006), portanto é esperada a presença destes fungos na parte basal ou das raízes das plantas, e isso foi confirmado, como também a presença destes patógenos na parte aérea das plantas, mesmo que em menores proporções. *F. verticillioides* foi detectado na região do colo das plantas emergidas assintomáticas em uma incidência de 77% (potencial P1 em cultivo à 20 °C); para esta mesma parte das plantas, a incidência de *F. proliferatum* foi de 87% (potencial P2 à 20 °C); e para *F. subglutinans* a incidência máxima foi de 71% (potencial P1 à 26 °C). Em relação a avaliação da última inserção de folhas, a incidência máxima foi de 24% foi registrada para *F. proliferatum*, no potencial P2 a 26 °C, seguido de *F. verticillioides*, com a incidência de 15% no potencial P1 a 26 °C e *F. subglutinans* com incidência de 8% no potencial P2 a 20 °C. Segundo Sartori e colaboradores (2004) em trabalho com *F. verticillioides* em sementes de milho, o fungo foi encontrado colonizando todas as partes de plantas originadas de sementes naturalmente contaminadas, sendo a maior porcentagem de transmissão de 46,1%, ocorrendo para o tegumento remanescente da semente, e já para base de folhas, a ocorrência foi de 14,6%.

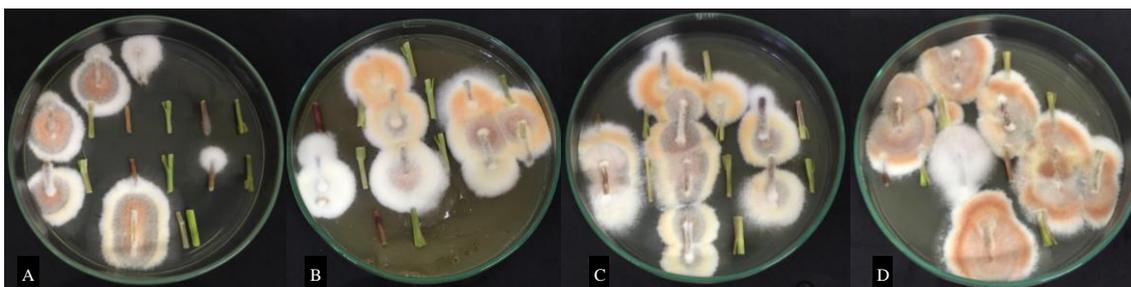


Figura 4. Fragmentos de plantas de milho assintomáticas apresentando colônias de *F. verticillioides* (CMLAPS355) originadas de sementes inoculadas com quatro potenciais de inóculo (A-P1(36 horas), B-P2 (72h), C-P3 (108h) e D P4 (144h)) e cultivadas nas temperaturas de 20 °C e 26 °C.

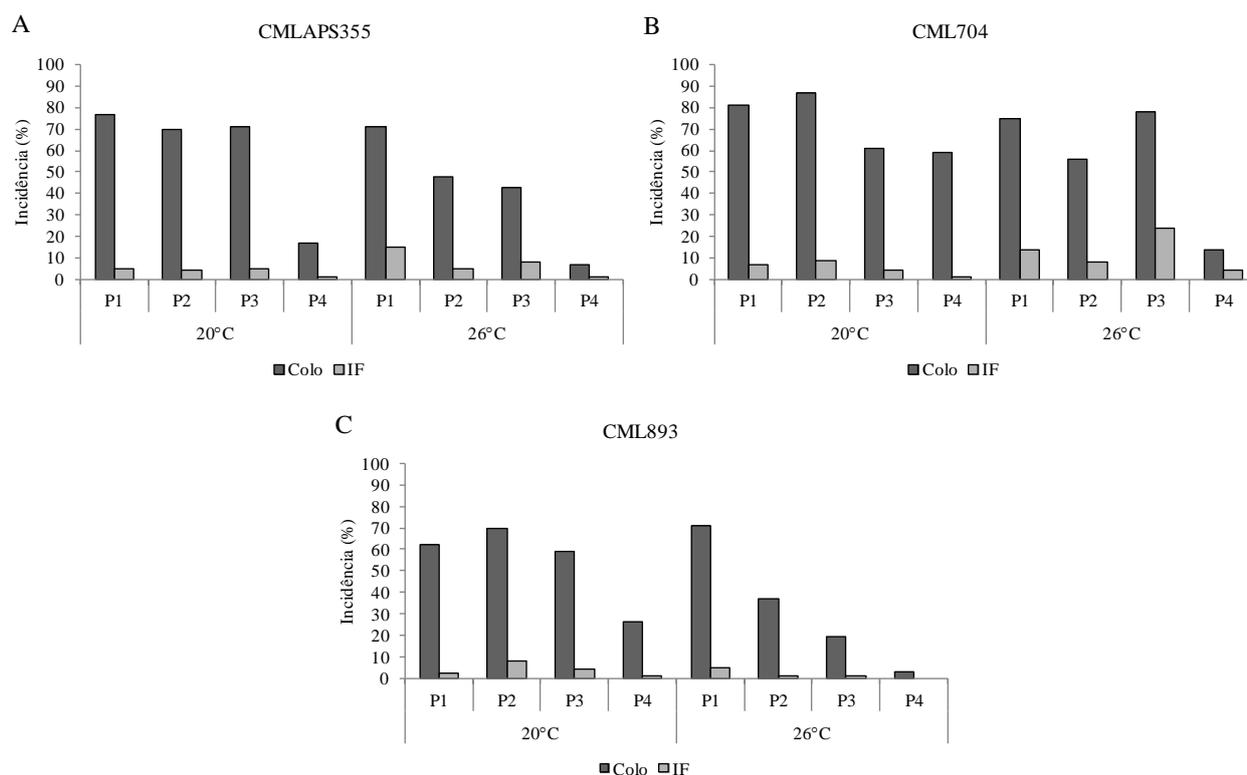


Figura 5. Incidência de A- *F. verticillioides* (CMLAPS355), B- *F. proliferatum* (CML704) e C- *F. subglutinans* (CML893) em partes seccionadas de plantas assintomáticas (colo e última inserção de folhas- IF) oriundas de sementes inoculadas com os potenciais de inóculo P1 (36 horas), P2 (72h), P3 (108h) e P4 (144h) e cultivadas em duas temperaturas, de 20 °C e 26 °C.

As taxas de transmissão real que leva em conta a presença dos fungos em tecidos de plantas emergidas e não emergidas a partir de inóculo associado às sementes pode ser considerada elevada para as três espécies de *Fusarium* estudadas neste trabalho, diferente do que ocorre com a maioria das espécies de outros fungos fitopatogênicos ao milho e outras espécies vegetais (Figura 6). As taxas mais altas observadas foram para plantas cultivadas à 26°C e no maior potencial de inóculo, isso confirma o favorecimento das condições proporcionadas nesta temperatura ao desenvolvimento dos patógenos. *F. verticillioides* apresentou

a maior taxa de transmissão real ou total de semente para planta, média de 98%, seguido de *F. proliferatum* com 95% e *F. subglutinans* com 88%.

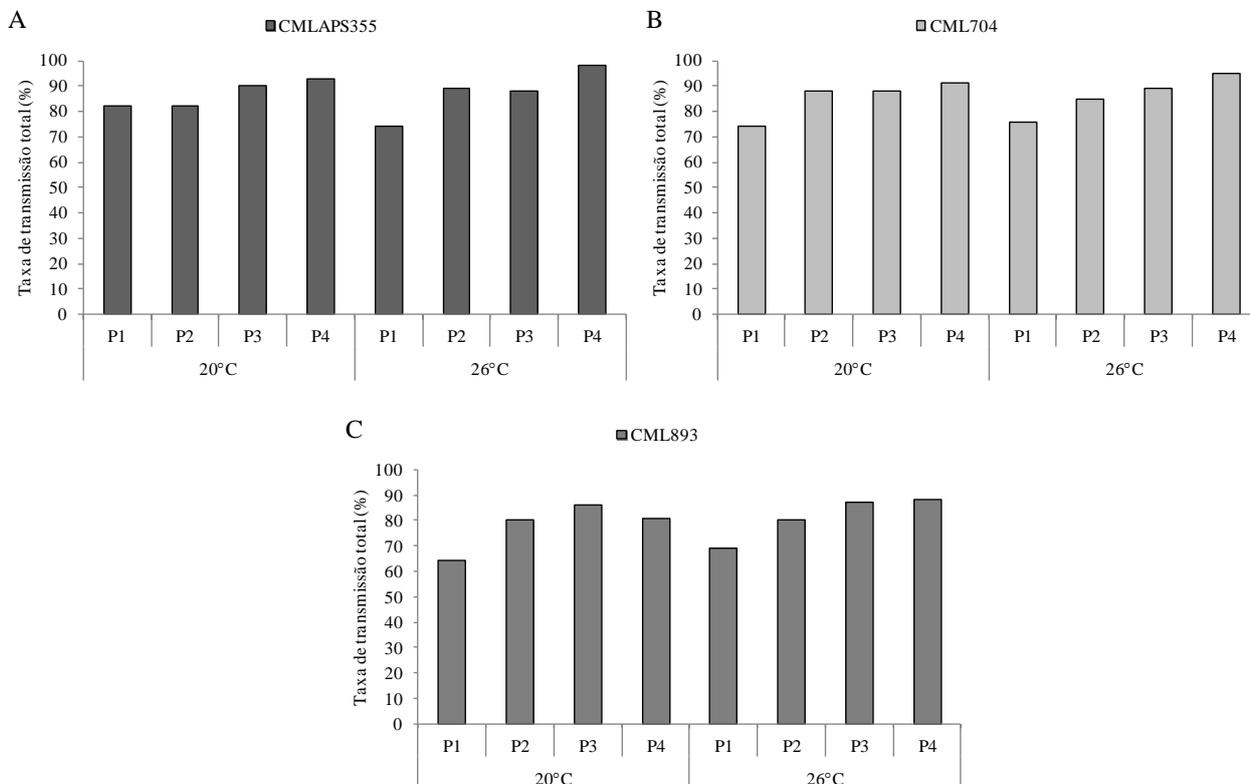


Figura 6. Taxa de transmissão total de A- *F. verticillioides* (CMLAPS355), B- *F. proliferatum* (CML704) e C- *F. subglutinans* (CML893), observando-se os resultados de sementes/plântulas com morte em pré-emergência e plantas assintomáticas. As sementes inoculadas com os potenciais de inóculo: P1 (36 horas), P2 (72h), P3 (108h) e P4 (144h) foram mantidas nas temperaturas de 20 °C e 26 °C.

Em comparação com outros patossistemas, de milho, já alvos de estudos pela mesma metodologia empregada neste trabalho, como nos casos de *Stenocarpella maydis* e *S. macrospora*, fica evidente que as taxas de transmissão total das sementes para plantas de milho são diretamente proporcionais e elevadas em relação aos níveis de potencial de inóculo dos patógenos iniciais nas sementes. Em comparação com as espécies de *Stenocarpella* no milho a diferença marcante das espécies de *Fusarium* estudadas neste trabalho é que nestas espécies a transmissão dos patógenos de sementes a plantas é mais pronunciada em plantas emergidas assintomáticas, embora em potenciais de inóculo mais elevados as diferenças destas taxas são bem próximas (SIQUEIRA et al., 2014; 2016).

5 CONCLUSÕES

Todas espécies: *F. verticillioides*, *F. subglutinans* e *F. proliferatum* foram transmitidos de sementes a plantas de milho, com taxas variáveis de acordo com a espécie, potencial de inóculo e temperatura de cultivo;

As maiores taxas de transmissão dos fungos foram observadas no maior potencial de inóculo, havendo uma proporcionalidade direta entre os níveis destas taxas e os níveis de potencial de inóculo dos patógenos. Os valores das taxas de transmissão dos potenciais de inoculo mais baixos foram praticamente similares entre si.

As maiores taxas de transmissão de todas as espécies de *Fusarium* foram registradas em cultivos na temperatura 26°C;

F. verticillioides e *F. subglutinans* apresentaram as maiores taxas de transmissão a partir das sementes de milho infectadas neste estudo;

Um significativo número das plantas assintomáticas de milho oriundas de sementes inoculadas pelas três espécies de *Fusarium* apresentaram-se infectadas na época de avaliação desta variável.

Com base nos valores de taxas de transmissão registradas em sementes e plântulas de milho mortas em pré-emergência, *F. verticillioides* foi a espécie mais agressiva neste trabalho

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGELOTTI, J.; SILVA, C. N. D.; PEREIRA, C. B.; TESSMANN, D. J. Avaliação da patogenicidade de espécies *Fusarium* na germinação de sementes de milho, Anais Eletrônico In: VIII EPCC – Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar UNICESUMAR – Centro Universitário Cesumar, Editora CESUMAR, Maringá – Paraná – Brasil 2013.

AGARWAL, V. K.; SINCLAIR, J. B. **Principles of seed pathology**. CRC Press. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida. 2 ed. cap 8, p.265, 1997.

BACON, C. W.; NELSON, P. E. Fumonisin production in corn by toxigenic strains of *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum*. **Journal of Food Protection**, v.57, n.6, p.514-521, 1994.

BATTILANI, P.; ROSSI, V.; PIETRI, A. Modelling *Fusarium verticillioides* infection and fumonisin synthesis in maize ears. **Aspects of applied biology**, v.1, p.91-100, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 2009a. 399p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de defesa Agropecuária. **Manual de Análise Sanitária de Sementes**. Brasília, DF, BR: MAPA/ACS. 1 ed., 2009b. 200p.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **THE FUNGI**. 2001. Academic Press - UK, cap.16, p.320-322.

CASA, R. T.; MOREIRA, E. N.; WILLE, L. A.; SANSIGOLO, A.; MIRANDA, F.; BOGO, A.; ALEXANDRE, F. Eficácia do tratamento de sementes de milho com fungicidas comercializadas em Santa Catarina e Rio Grande do Sul na safra de 2003/04. **Fitopatologia Brasileira**, Fortaleza, v.29, p.209. 2004.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; NERBASS, F. R. **Implicações epidemiológicas da transmissão de fungos em sementes de milho**. In: **Manejo de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo**. Lavras: UFLA, 2006. p. 202-212.

CASA, RICARDO T.; REIS, ERLEI M.; ZAMBOLIM, LAÉRCIO. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 427-439, 2006.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. **Doenças na cultura do milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular Técnica, 83).

CONAB - **Companhia Nacional de Abastecimento**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras> Acesso em: 28/06/2020

COSTA, R. V.; COTA, L. V.; ROCHA, L. M. P.; NOLASCO, A. A. R.; SILVA, D. D.; PARREIRA, D. F.; FERREIRA, P. **Recomendação de cultivares de milho para a resistência a grãos ardidos**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2010. 8 p. (Circular Técnica, 154).

COTTEN T.; MUNKVOLD G. Survival of *Fusarium moniliforme*, *F. proliferatum*, and *F. subglutinans* in maize stalk residue. **Phytopathology**, v.88, n.6, p.550-555, 1998.

DUCAN, K. E.; HOWARD, R. J. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*, **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 23, p. 6-16, 2009.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducao6_1ga1c_eportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=3821&p_r_p_-996514994_topicoId=3723

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. **Principais doenças na cultura do milho**. Embrapa-CNPMS. Circular técnica, 2000.

FERREIRA, D. F. SISVAR: A computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

GASPERINI, A. M. **Biocontrole de *Fusarium verticillioides* em milho**. 2011. Bachelor's Thesis. Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

KABEERE, F.; HILL, M. J.; HAMPTON, J. G. The transmission of *Fusarium subglutinans* from maize seeds to seedlings. **Australasian Plant Pathology**, v.26, n.2, p.126-130, 1997.

LANZA, F. E.; ZAMBOLIM, L.; COSTA, R. V.; SILVA, D. D.; QUEIROZ, V. A. V.; PARREIRA, D. F.; MENDES, S. M.; SOUZA, A. G. C.; COTA, L. V. Aplicação foliar de fungicidas e incidência de grãos ardidos e fumonisinas totais em milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, n.5, p.638-646, 2016.

- LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A. **The Fusarium laboratory manual**. 1. ed. USA: Blackwell Publishing, 2006. 388 p.
- MACHADO, J. D. C., MACHADO, A. Q., POZZA, E. A., MACHADO, C. F.; ZANCAN, W. L. A. Inoculum potential of *Fusarium verticillioides* and performance of maize seeds. **Tropical Plant Pathology**, v.38, n.3, p.213-217, 2013.
- MACHADO, J.C.; BARROCAS, E.N.; COSTA, M.L.N.; GUIMARÃES, R.M; MACHADO, C. Uso da técnica de restrição hídrica ou condicionamento osmótico em patologia de sementes. **Revisão Anual de Patologia de Plantas** (Impresso), v.20, p.37-63, 2012.
- MACHADO, J. C.; DIAS, I. E.; SIQUEIRA, C. S.; CORREA, C. L. **Etiologia e métodos de detecção de organismos produtores de micotoxinas em sementes/grãos de milho**. In: Décio Karam; Paulo César Magalhães (Org.). Eficiência nas cadeias Produtivas e o Abastecimento Global. 1 ed. Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014, v. 1, p. 138-153.
- MACHADO, J. da C. **Patologia de sementes: fundamentos e aplicações**. MEC: ESAL: FAEPE, 1988.
- MICHEL, B. E.; RADCLIFFE, D. A computer program relating solute potencial to solution composition for five solutes. **Agronomy Journal**, Madison, v.87, n.1, p.131-136, Jan. 1995.
- MUNKVOLD, G. P. Cultural and genetic approaches to managing micotoxins in maize. **Annual Review of Phytopathology**, v. 41, p. 99-116, 2003.
- MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* diseases and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, v.109, p.705-713, 2003.
- MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize: can we reduce their occurrence? **Plant Dis.**, v.81, n.6, p.556-565, 1997.
- NERBASS, F. R. Tratamento de sementes de milho: qualidade comercial, erradicação e transmissão de *Fusarium verticillioides*. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, para obtenção do título de Mestre em Produção Vegetal. 2008.
- NGUYEN, T. T. X.; DEHNE, H. W.; STEINER, U. Histopathological assessment of the infection of maize leaves by *Fusarium graminearum*, *F. proliferatum*, and *F. verticillioides*. **Fungal biology**, v.120, n.9, p.1094-1104, 2016.
- O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E.; NIRENBERG, H. I. Molecular systematics and phylogeography of the *Gibberella fujikuroi* species complex. **Mycologia**, Standford, v. 90, n. 3, p. 465-493, 1998.
- PAES, M.C.D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA/CNPMS, 2006. 14 p. (Circular técnica, 75).
- ONO, E. Y. S.; HIROOKA E. Y.. Milho: riscos associados à contaminação por *Fusarium verticillioides* e fumonisin. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.24.2, p. 359-378, 2003.
- PEREIRA, O. A. P.; CARVALHO, R. V.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4.ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v.2, 666p.
- PINTO, NFJ de A. **Grãos ardidos em milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Circular Técnica 66, 2005.

- PINTO, N. F. J. A. **Qualidade sanitária de grãos de milho**. Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado Técnico, 30, 2001. 4p,14p.
- POSTIC, J.; COSIC, J.; VRANDECIC, K.; JURKOVIC, D.; SALEH, A. A.; LESLIE, J. F. Diversity of *Fusarium* species isolated from weeds and plant debris in Croatia. **J. Phytopathol.**, v.160, n.2, p.76-81, 2012.
- REIS, E. M.; CASA, R. T.; BRESOLIN, A. C. R. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Grapel, 144 p. 2004.
- REIS, E. M.; ZOLDAN, S. M.; GERMANO, B. C. **Mecanismos de transmissão de fitopatógenos de sementes para órgãos aéreos**. OR Melhoramento de sementes Ltda. Passo Fundo - RS, 2014.
- SAMSUDIN, N. I.; MAGAN, N. Efficacy of potential biocontrol agents for control of *Fusarium verticillioides* and fumonisin B1 under different environmental conditions. **World Mycotoxin Journal**, v. 9, p. 205-213, 2015.
- SARTORI, A. F.; REIS, E. M.; CASA, R. T. Quantificação da transmissão de *Fusarium moniliforme* de sementes para plântulas de milho. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.4, p.456-458, 2004.
- SILVA, H.; FANTIN, G. M.; RESENDE, I. C.; PINTO, N. F. J. A.; CARVALHO, R. V. **Manejo Integrado de Doenças na Cultura do Milho de Safrinha In: Seminário Nacional De Milho Safrinha**. Londrina: Iapar. 2001, p.113-144.
- SIQUEIRA, C.S.; BARROCAS, E.N.; MACHADO, J.C.; CORRÊA, C. L. Transmission of *Stenocarpella maydis* by maize seeds. **Revista Ciência Agronômica**, v.47, n.2, p.393-400, 2016.
- SIQUEIRA, C. S.; MACHADO, J. C.; BARROCAS, E. N.; ALMEIDA, M. F. Potential for transmission of *Stenocarpella macrospora* from inoculated seeds to maize plants grown under controlled conditions. **Journal of Seed Science**, v. 36, p. 154-161, 2014.
- TAPIA, C.; AMARO, J. Género *Fusarium*. **Revista chilena de infectologia**, v. 31, n. 1, p. 85-86, 2014.
- VILJOEN, A.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, M. J.; VILJOEN, C. D. Characterization of *Fusarium subglutinans* f.sp. *pini* causing root disease of *Pinus patula* seedlings in South Africa. **Mycology**, v.101, p.437-445, 1997.
- WHITE, D.G. **Compendium of corn diseases**. Third Edition St. Paul: The American Phytopathological Society, 1999.
- WIDYASTUTI, S. M.; CHRISTITA, M.; HARJONO, H.; CHRISTANTI S. The Infection Process of *Fusarium Subglutinans* in *Pinus merkusii* seedlings. **Journal of Agricultural Science**, v.36, n.2, p.134-145, 2014.
- WILKE, A. L.; BRONSON, C. R.; TOMAS, A.; MULKVOLD, G. P. Seed transmission of *Fusarium verticillioides* in maize plants grown under three different temperature regimes. **Plant Disease**, v. 91, p. 1109-1115, 2007.
- ZANCAN, W. L. A.; MACHADO, J. C.; BAUTE, N. L.; SOUSA, B. F. M. Relationship between mycelial inoculum of *Sclerotinia sclerotiorum* and performance of sunflower seeds under controlled condition. **Bioscience Journal**, v. 31, p. 775-784, 2015.