

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA - MESTRADO

FILIPPE LEMOS JACQUES

**EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS *in vitro* E EM CASA DE
VEGETAÇÃO NO CONTROLE DE *Colletotrichum graminicola***

PONTA GROSSA

2015

FILIPPE LEMOS JACQUES

**EFEITO DE PRODUTOS ALTERNATIVOS *in vitro* E EM CASA DE
VEGETAÇÃO NO CONTROLE DE *Colletotrichum graminicola***

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Ponta Grossa para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de concentração em Agricultura.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maristella Dalla Pria

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

J19 Jacques, Filipe Lemos
Efeito de produtos alternativos in vitro e em casa de vegetação no controle de Colletotrichum graminicola/ Filipe Lemos Jacques. Ponta Grossa, 2015. 55f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia - Área de Concentração: Agricultura), Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Orientadora: Profª Drª Maristella Dalla Pria Dalla Pria.

1.Controle alternativo. 2.Indução de resistência. 3.Zeamays. 4.Antracnose. I.Dalla Pria, Maristella Dalla Pria. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Mestrado em Agronomia. III. T.

CDD: 633.15



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: “Efeito de produtos alternativos *in vitro* e em casa de vegetação no controle de *Colletotrichum graminicola*”.

Nome: Filipe Lemos Jacques

Orientadora: Maristella Dalla Pria

Aprovado pela Comissão Examinadora:

Prof^ª Dr^a Maristella Dalla Pria

Prof^ª Dr^a Louise Larissa May de Mio

Prof. Dr. David de Souza Jaccoud Filho

Data da Realização: 07 de agosto de 2015.

Ao meu avô Rubens *in memoriam*,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por me conceder saúde e capacidade para enfrentar as batalhas diárias a que fui confrontado e por me direcionar sempre ao caminho da fé e esperança mesmo quando os fatos demonstravam o contrário.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela possibilidade de cursar este curso de pós-graduação e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de pesquisa.

À minha mãe, Ceila, pela educação e por acreditar em mim em todos os momentos. Por ser sempre firme e até mesmo dura em muitas vezes, me ensinando a ser sempre um ser humano correto, profissional e ético acima de tudo. Não deixando me esquecer de também ser gentil, leal e amigo, jamais deixando de ser sincero.

À minha família, em especial minhas avós Ramona e Geralda, que sempre me recebem com muito amor e admiração durante minhas visitas. À minha irmã Izabela (Belinha), que sempre foi minha companheira, desde o nascimento, e que nem a distância fez fazer diferente. À minha tia Simone, pessoa de personalidade forte, que me ensinou, acima de tudo, a enfrentar o medo da incerteza do futuro com coragem e determinação. Ao meu pai, que por mais que tenhamos muito poucos momentos juntos, sempre tenta acrescentar a mim dedicação e profissionalismo.

À Luciane Henneberg e Zima Richter, técnicas do laboratório 26, que se tornaram grandes amigas durante esses dois anos, sempre ajudando nos trabalhos e dando conselhos muito providenciais.

Aos amigos que ganhei na UEPG, Carlos Eduardo C. Truylio (CDC), Clélio Marsola Júnior (Juninho), Aline Machado e André C. Auler, pelo apoio nos trabalhos de pesquisa e também pelos momentos de distração e diversão. À Tamires Corrêa, que me acolheu nos meus primeiros momentos em Ponta Grossa e também quem me incentivou a vir estudar a mais de mil quilômetros de casa.

À minha namorada Hagata S. Hennipman, por todo amor, companheirismo, parceria, por compartilhar tanto os momentos bons como os

ruins e por sempre me apoiar nas minhas ideias muitas vezes sonhadoras demais. Por sempre me ajudar nos trabalhos, mesmo nos domingos mais frios ou chuvosos. Mas, acima de tudo, por ser meu presente de Deus.

À professora Maristella Dalla Pria, pessoa que admiro muito, por desde minha chegada na UEPG ter me acolhido como filho, ou melhor, como um amigo. Por ter aceitado me orientar sob condições muito críticas geradas por conflitos alheios a nossa vontade e por sempre transmitir tranquilidade, sensatez e muita praticidade, acalmando os meus nervos com apenas uma simples conversa.

Muito obrigado!

“Transportai um punhado de terra todos os dias e fareis uma montanha”.
(Confúcio)

RESUMO

A antracnose do milho causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* pode ocorrer tanto nas folhas como nos colmos da planta e pode ocasionar grandes danos a cultura. Em busca de alternativas ao uso de fungicidas associados à utilização de variedades resistentes, principal método de controle de doenças, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial de controle de *C. graminicola* em testes *in vitro* e a indução de resistência em plantas de milho em condições de casa de vegetação por meio da utilização de diferentes produtos de origem abiótica e biótica. Para os testes *in vitro* foram testados os fertilizantes foliares High Roots®, V6®, Maxi Flor®, Max Fruit®, Foskalium® 30-20 e fosfito de manganês, o extrato de *Ascophyllum nodosum* (Acadian®), os produtos biológicos *Bacillus subtilis* (Serenade®) e *Bacillus thuringiensis* (Dipel WP®) e a testemunha (sem adição de produtos). Os produtos foram incorporados em meio de cultura de aveia fundente nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm, onde foi adicionado ao centro das placas de Petri um disco de micélio do fungo. A testemunha consistiu em placas de Petri sem a incorporação dos tratamentos com um disco de micélio do patógeno no centro. Diariamente foi determinado o diâmetro das colônias para avaliação do crescimento micelial do fungo. Com os dados foram calculadas a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC) e o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Os tratamentos com *B. subtilis* e *B. thuringiensis* foram os únicos que controlaram em 100% o desenvolvimento de *C. graminicola*. Outros tratamentos apresentaram controle total apenas na dose de 1000 ppm. Nos testes em casa de vegetação, além dos tratamentos utilizados *in vitro* na concentração que apresentou maior controle, foi adicionado o produto acibenzolar-S-metílico (Bion®), que foram pulverizados nas plantas de milho no estádio V4. Após 72 horas da pulverização dos tratamentos foi pulverizada a suspensão de conídios de *C. graminicola* e após o aparecimento das primeiras lesões foram avaliadas a severidade e o número de lesões cm⁻² nas folhas. Com os dados foram calculadas a área abaixo da curva de progresso da doença e a área abaixo da curva de frequência de infecção. O único tratamento que controlou a doença foi o acibenzolar-S-metílico.

Palavras-chave: Controle alternativo, indução de resistência, *Zea mays*, antracnose.

ABSTRACT

The anthracnose of corn caused by *Colletotrichum graminicola* can occur both on leaves and stems of the plant and can cause extensive damage to the culture. In search of alternatives to the use of fungicides associated with the use of resistant varieties, main disease control method, the objective of this study was to evaluate the potential of control of *C. graminicola* in *in vitro* tests and the induction of resistance in corn plants in greenhouse conditions using different products abiotic and biotic. For *in vitro* tests were tested foliar fertilizer High Roots®, V6®, Maxi Flor®, Max Fruit®, Foskalium® 30-20 and manganese phosphite, the *Ascophyllum nodosum* extract (Acadian®), organic products *Bacillus subtilis* (Serenade®) and *Bacillus thuringiensis* (Dipel WP®) and control (without adding products). The products were incorporated into the oat medium melting at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 ppm, which was added to the center of Petri dishes a fungi mycelium plug. The treatment control consisted of petri dishes without the incorporation of the treatments with a pathogen mycelial plug in the center. Daily was determined the diameter of the colonies to assess the mycelial growth of the fungus. With the data we calculated the percentage of inhibition of mycelial growth and the mycelial growth rate index. The treatment with *B. thuringiensis* and *B. subtilis* were the only ones that controlled at 100% the development of *C. graminicola*. Other treatments had total control at the dose of 1000 ppm. In tests in the greenhouse, in addition to the treatments used *in vitro* at concentrations that presented greater control, it was added acibenzolar-S-methyl (Bion®), which were sprayed on corn plants in V4 stage. After 72 hours of spraying the treatments was sprayed a suspension of spores of *C. graminicola* and after the first appearance of lesions were evaluated the severity and number of 2 cm lesions on the leaves. These data were calculated area under the disease progress curve and the area under the curve for infection frequency. The only treatment which controlled the disease was acibenzolar-S-methyl.

Keywords: alternative control, induced resistance, *Zea mays*, anthracnose.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquema representativo do método de diluição em série para a obtenção das concentrações dos produtos utilizados nos experimentos *in vitro*. 26
- Figura 2. Colônia de *Colletotrichum graminicola* completamente desenvolvida e esporulada (A); Disco de micélio do mesmo fungo repicado em placa de Petri com meio de aveia + incorporação dos produtos (B). 26
- Figura 3. Câmara úmida e escura para viabilização de germinação de esporos e infecção de *Colletotrichum graminicola* inoculado em plantas de milho (*Zea mays*) em casa de vegetação. 30
- Figura 4. Crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola* apenas no disco de repicagem, não atingindo o meio de cultura de aveia com o tratamento *Bacillus subtilis* na concentração de 1000 ppm. 33
- Figura 5. Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC) *in vitro* de *Colletotrichum graminicola* submetidos a diferentes tratamentos nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm, experimento 1. Manganês, Zinco e Molibdênio (A); Fosfito de Potássio (B); *Ascophyllum nodosum* (C); Fosfito de Manganês (D); Fertilizante NK (High Roots®) (E); Fertilizante NK (Maxi Flor®) (F); Cálcio (G); *significativo ao nível de 5% de probabilidade; **significativo ao nível de 1% de probabilidade. 37
- Figura 6. Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC) *in vitro* de *Colletotrichum graminicola* submetidos a diferentes tratamentos nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm, experimento 2. Manganês, Zinco e Molibdênio (A); Fosfito de Potássio (B); *Ascophyllum nodosum* (C); Fosfito de Manganês (D); Fertilizante NK (High Roots®) (E); Fertilizante NK (Maxi Flor®) (F); Cálcio (G); *significativo ao nível de 5% de probabilidade; **significativo ao nível de 1% de probabilidade. 38
- Figura 7. Colônias de *Colletotrichum graminicola* (Experimento 1) com seis dias de idade com incorporação dos tratamentos no meio de cultura nas doses 0, 1, 10, 100 e 1.000 ppm. *Ascophyllum nodosum* (A); *Bacillus thuringiensis* (B); fosfito de manganês (C); fosfito de potássio (D); fertilizante NK (High Roots®) (E); cálcio (F); fertilizante NK (Maxi Flor®) (G); *Bacillus subtilis* (H); manganês, zinco e molibdênio (I). . 39

Figura 8. Colônias de *Colletotrichum graminicola* (Experimento 2) com seis dias de idade com incorporação dos tratamentos no meio de cultura nas doses 0, 1, 10, 100 e 1.000 ppm. *Ascophyllum nodosum* (A); *Bacillus thuringiensis* (B); fosfito de manganês (C); fosfito de potássio (D); fertilizante NK (High Roots®) (E); cálcio (F); fertilizante NK (Maxi Flor®) (G); *Bacillus subtilis* (H); manganês, zinco e molibdênio (I). . 40

Figura 9. Severidade (%) da antracnose (*Colletotrichum graminicola*) da folha do milho (*Zea mays*) (A) e número de lesões cm⁻² (B) de *C. graminicola* em plantas de milho com a pulverização de diferentes tratamentos em diferentes períodos de avaliação após a inoculação artificial de esporos. Ponta Grossa, PR, 2015. 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tratamentos e dosagem utilizados para controle de <i>Colletotrichum graminicola</i> em plantas de milho (<i>Zea mays</i>) em casa de vegetação. Ponta Grossa, PR, 2015.....	29
Tabela 2. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) de produtos alternativos <i>in vitro</i> sobre <i>Colletotrichum graminicola</i> em diferentes concentrações. Ponta Grossa, PR, 2015.	32
Tabela 3. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de <i>Colletotrichum graminicola</i> submetido ao efeito de produtos alternativos em diferentes concentrações <i>in vitro</i> . Ponta Grossa, PR, 2015.	36
Tabela 4. Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da antracnose foliar (<i>Colletotrichum graminicola</i>) em plantas de milho (<i>Zea mays</i> L.) sob condições de casa de vegetação. Ponta Grossa, PR, 2015.	44
Tabela 5. Número de lesões cm ⁻² e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de antracnose foliar (<i>Colletotrichum graminicola</i>) em plantas de milho (<i>Zea mays</i> L.) sob condições de casa de vegetação. Ponta Grossa, PR, 2015.	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVO	14
3	REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1	CULTURA DO MILHO	15
3.2	ANTRACNOSE FOLIAR DO MILHO.....	17
3.3	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA.....	18
3.3.1	RESISTÊNCIA LOCAL OU HIPERSENSÍVEL.....	21
3.3.2	RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA	22
3.3.3	RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	25
4.1	EXPERIMENTOS <i>in vitro</i>	25
4.2	EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.....	28
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	EXPERIMENTOS <i>in vitro</i>	31
5.2	EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO	41
6	CONCLUSÃO	48
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
8	ANEXOS	54
9	APÊNDICES	55

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a agricultura mundial tem atendido a demanda crescente por alimentos de uma população crescente. Dentro do cenário mundial de produção agrícola, o Brasil apresenta grande destaque, onde é conhecido como o “celeiro do mundo” (SCOLARI, 2014).

Com relação à produção de milho (*Zea mays* L.), o Brasil está na terceira posição como maior produtor mundial, perdendo apenas para Estados Unidos e China. No cenário agrícola do país, a produção de grãos corresponde a uma área plantada de 53.899 mil hectares na safra de verão, tendo as culturas da soja e do milho como as mais exploradas. De acordo com dados da CONAB (2014), para o ano agrícola de 2013/2014, a área plantada de milho somou um total de 15.800,7 mil hectares (6.618,0 mil ha na safra de verão e 9.182,7 mil ha na safrinha).

Dentre os fatores que mais ocasionam danos às lavouras de milho, as doenças são responsáveis por redução em torno de 14% da produção agrícola mundial (MIZUBUTI; MAFFIA, 2013). A antracnose (*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils), uma das principais doenças incidentes na cultura, pode reduzir a produção em torno de 40%, tanto pela redução de área foliar como pelo tombamento das plantas causado pela podridão de colmos.

O objetivo prático mais importante dentro da Fitopatologia é o controle de doenças de plantas. Tal fato é tido como justificativa para tantos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de produtos com esse intuito. Buscando-se altas produtividades com práticas altamente eficientes, os fungicidas passaram a ser muito utilizados, impactando grandemente o meio ambiente e favorecendo o surgimento de resistência dos patógenos a estes produtos (KUHN, 2007).

A preocupação com o ambiente e a presença de resíduos de agrotóxicos em alimentos aliado a exigência cada vez maior do mercado em adquirir produtos mais saudáveis e de baixo impacto ambiental têm levado pesquisadores a buscar medidas alternativas para o controle de doenças de plantas. Dentre essas alternativas, o emprego do controle biológico e da indução de resistência tem surgido como tecnologia de grande potencial. Os

indutores apresentam baixo impacto ambiental, o que torna seu uso no controle de doenças de plantas muito atrativo (PIERO; GARDA, 2008). Apesar disso, por mais que se conheçam seus efeitos no meio científico, trabalhos que busquem avaliar a efetividade deles na cultura do milho ainda são escassos.

2 OBJETIVO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial de controle de *Colletotrichum graminicola*, *in vitro*, com a utilização de diferentes produtos. Avaliar o potencial de indução de resistência de diferentes produtos em plantas de milho sob condições de casa de vegetação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é a planta cultivada com maior importância dentre as originárias das Américas. Há indícios de que sua origem tenha sido no México, América Central ou Sudoeste dos Estados Unidos. Escavações arqueológicas e geológicas demonstram que o milho é uma das culturas mais antigas do mundo, indicando que seu cultivo ocorria desde pelo menos 5.000 anos atrás. Logo depois do descobrimento da América, a planta foi levada para o continente Europeu, onde era cultivado em jardins, até que seu valor alimentício se tornasse conhecido. Desde então, passou a ser cultivado em escala comercial espalhando-se por todo o mundo (GOODMAN, 1978).

O milho, por seu potencial produtivo, composição química, valor nutritivo e multiplicidade de aplicações, seja na alimentação humana, seja na animal, firmou-se, ao longo da história, como um dos mais importantes cereais cultivados e consumidos, exercendo relevante papel socioeconômico e constituindo matéria-prima indispensável, capaz de impulsionar os mais diversificados complexos agroindustriais. Esse cereal destaca-se como uma das principais culturas do agronegócio brasileiro. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial, atrás apenas dos Estados Unidos e da China, com produtividade média de 5.233 kg ha⁻¹, na safra 2015, a qual foi maior que a safra anterior com 5.169 kg ha⁻¹ (CARVALHO et al., 2013; FANCELLI; DOURADO NETO, 2004; IBGE, 2015).

Para a safra de 2015, foi produzida no Brasil cerca de 76,3 milhões de toneladas de grãos, onde em torno de 30,8 milhões de toneladas foram produzidas na primeira safra (verão) e na segunda safra (safrinha) em torno de 45,5 milhões de toneladas, isso tudo somado em 15,241 milhões de hectares plantados. As Regiões Centro-Oeste, Sul e Sudeste como as maiores produtoras de milho, somaram para esta safra uma área plantada de aproximadamente 6,3 milhões, 3,7 milhões e 2,1 milhões de hectares, respectivamente (IBGE, 2015).

Além do potencial produtivo, outra importância da cultura do milho é a sua participação no ciclo de rotação de culturas no sistema de plantio direto na

palha, principalmente para a cultura da soja. A cultura do milho contribui de maneira significativa para a obtenção de altas produtividades, em parte devido a maior extração de fósforo no sistema soja/milho quando comparado ao monocultivo de soja (MARCELO et al., 2009).

A cultura vem sendo cultivada em regiões entre as coordenadas 58° de latitude Norte (Canadá e antiga União Soviética) a 40° de latitude Sul (Argentina), presente nas mais diversas altitudes, cultivada tanto em localidades abaixo do nível do mar (como a Região do Mar Cáspio) como em regiões com mais de 2.500 m de altitude, como nos Andes Peruanos (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

O milho, como uma planta rústica, sempre foi capaz de suportar muito bem diversos tipos de estresse ambiental. Porém, com a expansão das fronteiras agrícolas, com o monocultivo e ampliação das épocas de semeadura, o cenário se alterou. Surgiram novos problemas para a cultura, principalmente em relação às doenças, que podem afetar grandemente o desempenho das lavouras gerando grandes prejuízos econômicos (PEREIRA, 2005).

Dentre as principais doenças que atacam a cultura, destacam-se a antracnose (*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils), podridões do colmo (causada por *C. graminicola* e também por outras várias espécies de fungos), míldio (*Peronosclerospora sorghi* (Weston & Uppal.) C.G.Shaw), manchas foliares (Cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum* (Pass.) K. J. Leonard & E. G. Suggs), mancha de *Bipolaris maydis* (Y.Nisik. & C.Miyake) e mancha de *Bipolaris zeicola* (G.L. Stout) Shoemaker, mancha foliar de diplodia (*Stenocarpella macrospora* (Earle) B. Sutton)), ferrugem branca (*Phyzopella zeae* (Mains) Cummins e Ramachar), ferrugem comum (*Puccinia sorghi* Schw.) e ferrugem polissora (*Puccinia polysora* Underw), podridões da espiga (podridão de Giberela (*Gibberella zeae* (Schweinitz) Petch), podridão branca da espiga (*S. macrospora* e *Stenocarpella maydis* (Berk.) B. Sutton), carvão (*Ustilago maydis* (DC.) Corda) e muitas outras (PEREIRA, 2005; SABATO; FERNANDES, 2014).

3.2 ANTRACNOSE FOLIAR DO MILHO

A antracnose do milho, causada pelo fungo *C. graminicola* (teleomorfo *Glomerella graminicola* Politis) pode atacar a planta de milho em todas as suas fases de desenvolvimento e os sintomas podem ocorrer em qualquer parte da planta. No limbo foliar causa lesões necróticas que são facilmente visíveis, caracterizadas por seu formato alongado e coloração marrom. No colmo, os sintomas na casca surgem logo após a polinização como lesões estreitas, encharcadas, inicialmente de coloração pardo-avermelhada, tornando-se castanho-escuras ou pretas com o tempo. No interior dos colmos, os tecidos ficam escuros e se desintegram. Sinais do patógeno, acérvulos com esporos, podem ser encontrados na casca do colmo em sua forma assexuada. No Brasil, hoje em dia, as duas formas de ataque (folha e colmo) são consideradas limitantes à cultura, principalmente pela adoção do cultivo em plantio direto na palha e pelo aumento do cultivo do milho safrinha. (PEREIRA, 2005).

Com relação à biologia do patógeno, o fungo forma acérvulos esféricos ou piriformes de 8 a 15µm com a presença de setas sobre o tecido afetado (sinais). Os conídios são falciformes e medem em torno de 23,5 - 29,0 µm x 3,5 - 5,0 µm quando em meio de cultura (SUTTON, 1980; PONTES, 1987). O patógeno pode sobreviver como saprófita em resíduos culturais por até dez meses, na superfície do solo (NAYLOR; LEONARD, 1977), porém, se forem enterrados, a possibilidade de sua sobrevivência é reduzida. Já em sementes, pode sobreviver por até 3 anos (WARREN, 1977).

Os conídios podem permanecer viáveis de semanas a meses, dependendo da umidade relativa do ar e desde que estejam recobertos por uma matriz mucilaginosa que é produzida pelo próprio fungo (NICHOLSON; MORAES, 1980). Sua dispersão ocorre por respingos de chuva ou pelo vento (BERGSTROM; NICHOLSON, 1999). A presença de água é necessária para a germinação dos conídios, pois solubiliza os inibidores da germinação presentes na matriz mucilaginosa.

A colonização do patógeno em plantas de milho ocorre normalmente através da germinação de conídios quando em contato com o limbo foliar, na parte aérea. Segundo Bergstrom e Nicholson (1999), as lesões foliares podem servir como fonte de inóculo para infecções no colmo que podem causar

tombamento da planta e que, como consequência, reduz a produtividade da cultura entre 18 e 40%.

Sukno et al. (2008) constataram que plantas de milho podem ser infectadas com *C. graminicola* também pelas raízes, através de estruturas especializadas comumente encontradas em patógenos de solo, como micélios externos de penetração intercelular (como ocorrem em fungos micorrízicos), hifopódio (hifa de forma globosa ou alongada com função de fixação) e microescleródios. A infecção pode ser transmitida para a parte aérea de forma assintomática, onde posteriormente aparecerão os sintomas característicos.

Por ser hemibiotrófico, capaz de sobreviver em restos de cultura, *C. graminicola* ganhou importância entre os patógenos da cultura do milho, sobretudo nas áreas com sistema de plantio direto na palha (PINTO et al., 2006). No Brasil, essa doença é um dos principais problemas da cultura do milho, ocorrendo em todas as principais regiões produtoras do país, seja em cultivos de safrinha, seja em plantios efetuados em períodos normais (FANCELLI; DOURADO NETO, 2004).

As medidas de controle mais indicadas para a doença são uso de cultivares resistentes, adubação equilibrada e rotação de culturas (PEREIRA, 2005).

3.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA

Quando se estuda sobre resistência de plantas à patógenos percebe-se que a ocorrência da doença é exceção e não regra, pois dentre o número gigantesco de fitopatógenos existentes na natureza, apenas uma pequena quantidade pode causar doença em uma determinada espécie. Isso pode ser explicado pelo fato de existirem múltiplos mecanismos de defesa nas plantas que podem ser muito eficientes. A resistência natural de plantas a patógenos tem com base barreiras e mecanismos de defesa que já são existentes, sem que para isso seja necessária a chegada do patógeno ao sítio de infecção (AGRIOS, 2005; CAMARGO, 2011; BARROS et al., 2010) e os mecanismos pós-formados, ativados somente após a chegada do patógeno.

Pode-se assim afirmar que as plantas não permitem a entrada de patógenos de forma passiva no seu interior. Elas percebem as agressões e a sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo que em muitas vezes, tenham seu desenvolvimento prejudicado (MARGIS-PINHEIRO et al., 1999). Dessa forma, a resistência da planta a um determinado patógeno é definida como sendo a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada de um microorganismo patogênico em seu interior, assim como criar condições desfavoráveis para a infecção/colonização de seus tecidos pelo mesmo (PASCHOLATI, 2011).

As plantas são continuamente expostas a um grande número de patógenos, e como resultado, apresentam um complexo mecanismo de defesa para reconhecê-los e se proteger. A proteção se dá através do desenvolvimento de barreiras, mecanismos de defesa pré e pós-formados que restringem sua penetração, infecção/colonização. Os pré-formados são aqueles mecanismos de defesa existentes e independentes da chegada do patógeno no sítio de infecção. Já os pós-formados são mecanismos que permanecem inativos ou latentes, sendo acionados somente após a chegada do patógeno. Em ambas as categorias, os fatores envolvidos na resistência podem ser subdivididos em estruturais ou bioquímicos. Os estruturais atuam como barreiras físicas, enquanto os bioquímicos atuam através da produção de substâncias tóxicas, repelentes ao patógeno, ou criando condições adversas ao estabelecimento deste na planta (PASCHOLATI, 2011).

Dentre os mecanismos de defesa pré-formados destacam-se: ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, além de substâncias químicas pré-formadas, como os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fototoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas. Já os pós-formados envolvem a formação de papila, halos, lignificação, camada de cortiça, formação de tiloses e deposição de goma, além de compostos como fitoalexinas, proteínas relacionadas a patogênese (Proteínas-RP) e espécies reativas de oxigênio (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI, 2011).

Em qualquer interação planta-patógeno há diversas possibilidades de resposta, variando de uma extrema suscetibilidade à resistência total. A resistência de plantas inclui resistência basal, resistência de raça ou espécie

específica, resistência relacionada à idade (Ontogenética), resistência órgão específica e resistência adquirida e induzida (IR). Em um sentido mais amplo, IR é a resistência causada pela ativação dos próprios percursos de defesa geneticamente programadas da planta hospedeira, resultando em mudanças que diminuem os efeitos de ataques bióticos subsequentes. A IR elicitada em plantas por microorganismos e outros microorganismos patogênicos foi identificada há mais de 100 anos. A maioria do conhecimento neste tipo de defesa foi obtido em estudos em plantas anuais ou plantas perenes de vida curta, como *Arabidopsis thaliana*, *Cucumis sativus* (pepino), *Lycopersicon* spp. (tomate), *Medicago truncatula*, *Nicotiana tabacum* (fumo), *Oryza* spp. (arroz), *Solanum* spp. (batata) e *Zea* spp. (milho) (EYLES et al., 2010).

Os primeiros trabalhos sobre o fenômeno da indução de resistência ocorreram em 1901, em estudos com a interação *Botrytis cinerea* x *Begonia* sp. (KESSMAN et al., 1994). Mais adiante, em 1933 foi observado em pesquisas que as plantas normalmente suscetíveis podiam adquirir resistência contra doenças após uma infecção primária causada por patógenos ou após o tratamento com suas formas atenuadas. Outro trabalho utilizando tubérculos de batata mostrou que a inoculação de uma área do tubérculo com uma raça avirulenta de *Phytophthora infestans* resultava em uma reação de hipersensibilidade e no acúmulo de fitoalexinas, o que impedia o crescimento da raça compatível nos tecidos (AGRIOS, 2005).

Em estudos com plantas de fumo após a infecção localizada com o *Tobacco mosaic virus* (TMV- vírus do mosaico do fumo), estas adquiriam resistência sistêmica contra vários patógenos resultando na concepção do termo “resistência sistêmica adquirida” (RSA ou SAR), designando as respostas de defesa induzidas de forma sistêmica pela interação com fatores externos, como radiação ultravioleta, produtos químicos e estruturas de microrganismos (AGRIOS, 2005). Já no Brasil, na década de 70, as primeiras pesquisas sobre resistência induzida abordaram o patossistema plantas de café (*Coffea arabica* L.) x *Hemileia vastatrix* Berk & Br., por meio da utilização de diversos indutores de origem biótica (SILVA et al., 2008).

De modo geral, o fenômeno da resistência induzida envolve três manifestações diferentes de resposta, a Resistência Local ou Hipersensível, a

Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e a Resistência Sistêmica Induzida (RSI).

3.3.1 RESISTÊNCIA LOCAL OU HIPERSENSÍVEL

A resistência local ou hipersensível, também chamada de reação de hipersensibilidade (RH), é uma resposta celular extrema por parte da planta que pode levar a um alto grau de resistência às doenças. Esta reação ocasiona a morte repentina de um número limitado de células da planta hospedeira que circundam o sítio de infecção. A reação é considerada como uma resposta de defesa induzida, causando a parada do crescimento e desenvolvimento do patógeno nos tecidos da planta. Os patógenos presentes no local de expressão da reação morrem rapidamente, pois são isolados pelo tecido necrosado (PASCHOLATI, 2011).

Este tipo de reação, onde ocorre um “suicídio” por parte de algumas células em benefício das outras, é um dos mecanismos de defesa mais importantes das plantas e ocorre em resposta de relações incompatíveis entre a planta e o patógeno. Em sua forma clássica, a reação de hipersensibilidade mostra-se como uma pequena lesão necrótica, visível a olho nu, que pode ocorrer em diferentes órgãos das plantas e é considerada como sinônimo de morte celular. Dessa forma, a infecção de plantas por um microrganismo fitopatogênico incompatível ou um microrganismo não patogênico pode induzir mudanças drásticas na atividade metabólica das células vegetais ao redor do sítio de invasão e levar a indução de resistência (PASCHOLATI, 2011; SILVA et al., 2008).

Comuns a todas as plantas e a diferentes patógenos, os aspectos fisiológicos da RH incluem o aumento rápido e transitório de agentes oxidantes, a perda de íons potássio (K^+) e ganho de íons hidrogênio (H^+) pelas células, a destruição de compartimentos e o espessamento das paredes celulares e da cutícula, além da síntese de toxinas (fitoalexinas) e proteínas relacionadas à defesa (conhecidas como proteínas PR, pathogenesis related). Também incluem alterações na permeabilidade da membrana plasmática, rápido movimento e agregação citoplasmática e elevação de taxas de respiração. Tudo isso resulta na formação rápida, menos de 24 horas após a infecção, de

halos necróticos ao redor do sítio de invasão e o consequente confinamento do fitopatógeno (BARROS et al., 2010; SILVA et al., 2010).

Embora essa reação tenha sido identificada há quase 100 anos, não está claro se sua característica primária, caracterizada pela morte celular, tem alguma função direta na resistência ou é consequência de mecanismos de sinalização que levariam aos eventos capazes de inibir a ação do patógeno (SILVA et al., 2010).

3.3.2 RESISTÊNCIA SISTÊMICA ADQUIRIDA

Diferentemente de outros seres vivos, as plantas não produzem anticorpos contra seus patógenos naturalmente, e a maioria de suas defesas bioquímicas ficam inativas até ocorrer a sinalização mobilizada pelo ataque de algum patógeno. É sabido há muitos anos, entretanto, que as plantas podem desenvolver uma resistência generalizada em resposta a uma infecção por um fitopatógeno ou pelo tratamento com certos produtos naturais ou sintéticos (AGRIOS, 2005).

Este fenômeno é chamado de Resistência Sistêmica Adquirida, também conhecida pela abreviação SAR, do inglês Systemic Acquired Resistance. Estudos comprovaram que além do caráter sistêmico, a SAR tem um efeito duradouro, podendo persistir por semanas ou até mesmo até o final da vida da planta. Outra característica do fenômeno é que o seu efeito é inespecífico, onde a inoculação com um patógeno pode proteger a planta contra outros patógenos. A SAR pode ser induzida por vários estímulos e não só por patógenos, pois parece ser uma resposta generalizada da planta a qualquer agente de estresse, até mesmo a um agente de natureza abiótica.

A indução da SAR é mediada por uma das vias hormonais da planta, a via do ácido salicílico, e é induzida geralmente por patógenos necrotróficos (CAMARGO, 2011).

A SAR é explicada pela manifestação ou produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção que provoca a necrose local e a translocação deste sinal para outras partes da planta, induzindo reações de defesa que protegerá a planta contra agressões subsequentes. Dentre os mecanismos induzidos de defesa pela SAR estão as modificações da parede celular, produção de

fitoalexinas, e ao mesmo tempo, um aumento da expressão de um grupo grande de genes, incluindo os que traduzem proteínas relacionadas à patogênese. O fenômeno apresenta como características a expressão contra um amplo espectro de microrganismos, tem a necessidade de um tempo após o tratamento indutor para que ocorra o estabelecimento do fenômeno, a duração da proteção se dá por um longo período e a atuação através de um processo multicomponente, podendo ser transmissível via enxertia e ser dependente das condições ambientais como luz, temperatura, concentração do indutor e do inóculo. Sua indução é dependente do ácido salicílico e geralmente é induzida por patógenos ou ativadores químicos (SILVA et al., 2008).

Por mais que a SAR não afete a germinação de esporos e a formação do apressório, a penetração é reduzida drasticamente em tecidos resistentes induzidos sistemicamente, provavelmente como resultado da formação de materiais semelhantes a papilas abaixo do apressório, que se tornam rapidamente impregnados com lignina e silício. Em alguns sistemas patógeno-hospedeiro, a SAR é caracterizada pela indução de atividade de peroxidase e de lipoxigenase que levam à produção de derivados de ácidos graxos, os quais exibem uma forte atividade antimicrobiana. Nas plantas que exibem SAR em resposta a ativadores de defesa, tais como o ácido salicílico, o crescimento bacteriano e multiplicação, por exemplo, são reduzidos drasticamente, mesmo que o ácido salicílico seja tolerado por bactérias em concentrações muito mais elevadas do que as encontradas em plantas tratadas (AGRIOS, 2005).

3.3.3 RESISTÊNCIA SISTÊMICA INDUZIDA

Assim como na SAR, na Resistência Sistêmica Induzida (RSI), após a exposição a um agente indutor, a planta tem seus mecanismos de defesa ativados não somente no sítio de indução, mas também em outros locais distantes dele. Pode-se dizer que os dois fenômenos são distintos, mas fenotipicamente semelhantes (PASCHOLATI, 2011).

Diferentemente da SAR, na RSI o indutor não provoca sintomas como a necrose no local da infecção, mas induz a planta a se proteger sistemicamente. Neste caso não há o acúmulo de proteínas-PR, a planta que sofreu indução

não exibe alterações (necrose) e o agente indutor é, normalmente, um agente não-patogênico (como bactérias não patogênicas e promotoras de crescimento) e a sua indução não é dependente do ácido salicílico, parecendo haver uma outra rota de sinalização que é regulada pelo ácido jasmônico e pelo etileno. Um exemplo dessa forma de resistência se dá pela utilização de rizobactérias promotoras de crescimento vegetal (RPCV), que, quando aplicadas ao solo, permaneceram localizadas na superfície radicular da planta induzindo resistência em outros órgãos da planta, como nas folhas e caules. Este fenômeno apresenta também um amplo espectro de atuação, ou seja, assim como na SAR, apresenta efetividade contra diferentes tipos de patógenos (SILVA et al., 2008; PASCHOLATI, 2011).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 EXPERIMENTOS *in vitro*

Os experimentos foram conduzidos no laboratório do curso de Agronomia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa e foram repetidos duas vezes.

Para ambos os experimentos foram testados os fertilizantes foliares High Roots® (N - 18%, K₂O - 6%), V6® (Mn - 2,5%; Zn - 1,9%; Mo - 0,16%), Maxi Flor® (N - 14%; K₂O - 6%), Max Fruit® (Ca - 4,61%), Foskadium® 30-20 (fosfito de potássio, P₂O₅ - 30%, K₂O - 20%) e fosfito de manganês (P₂O₅ - 36%, Mn - 7,0%), o extrato de alga *Ascophyllum nodosum* (Acadian® - K₂O - 5,3%, carbono orgânico total - 6,0 %) e os produtos biológicos à base de *Bacillus subtilis* (Serenade® - 13,68 g L⁻¹ (1,34%) - 1 x 10⁹ CFU g⁻¹) e à base de *Bacillus thuringiensis* (Dipel WP® - 32 g Kg⁻¹ (3,2%) - 25 bilhões de esporos viáveis g⁻¹) comparados à uma testemunha.

Foi utilizado o meio de cultura de aveia (10 g de farinha de aveia, 5 g de dextrose, 3 g de ágar e 250 mL de água destilada), como descrito por Jamil e Nicholson (1989) como sendo o melhor meio para desenvolvimento do fungo. O isolado do fungo *C. graminicola* utilizado nos testes foi proveniente da coleção de fungos da UEPG.

Os produtos foram incorporados no meio de cultura fundente, nas concentrações 1, 10, 100 e 1.000 ppm por diluição em série a partir de uma solução contendo 100 mL do meio de cultura na concentração de 1.000 ppm (Figura 1).

Para os produtos biológicos foi usada a metodologia de incorporação dos produtos no meio de cultura após a esterilização em autoclave, sem que o produto biológico fosse esterilizado. Conforme Figueiredo et al. (2010) não encontraram diferença significativa no crescimento micelial de vários fungos quando compararam a incorporação dos produtos em meio de cultura com o método de pareamento. Dessa forma, optou-se por utilizar a mesma metodologia de incorporação para todos os tratamentos.

Após a incorporação dos produtos e solidificação do meio de cultura nas placas de Petri, foram transferidos para o centro das placas de Petri discos de micélio do fungo de 0,6 cm de diâmetro proveniente de uma placa com colônia do fungo com 15 dias de idade, cultivada em BOD à $25\pm 2^\circ\text{C}$ e 12 horas de fotoperíodo, completamente desenvolvida e esporulada (Figura 2). A testemunha correspondeu a placas contendo apenas meio de cultura aveia, com um disco de micélio no centro, sem a incorporação dos produtos.

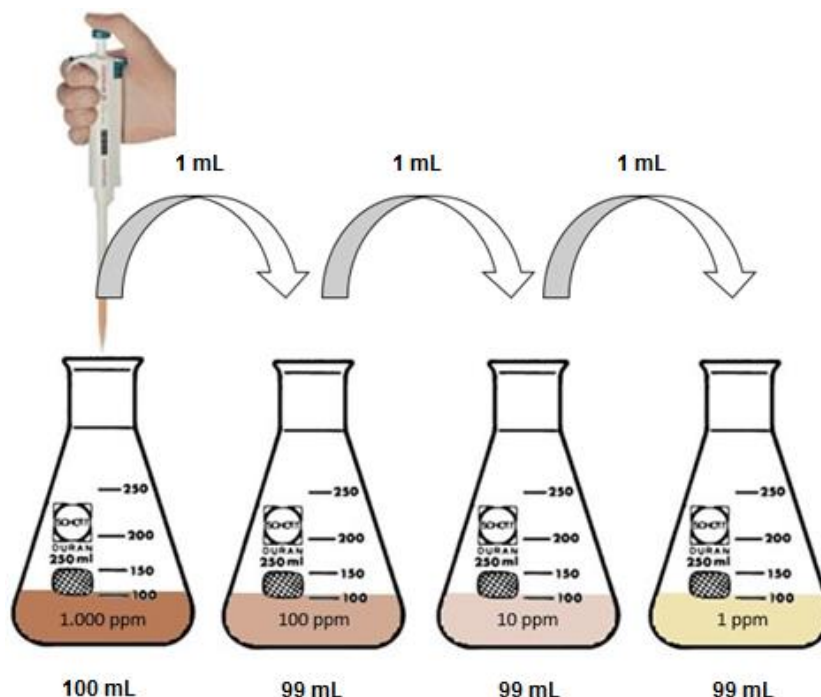


Figura 1. Esquema representativo do método de diluição em série para a obtenção das concentrações dos produtos utilizados nos experimentos *in vitro*.

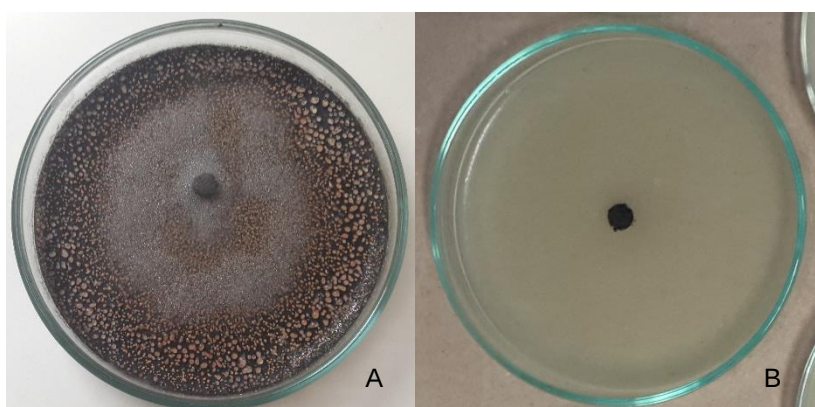


Figura 2. Colônia de *Colletotrichum graminicola* completamente desenvolvida e esporulada (A); Disco de micélio do mesmo fungo repicado em placa de Petri com meio de aveia + incorporação dos produtos (B).

As placas com as colônias foram incubadas em câmara tipo BOD à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ com 12 horas de fotoperíodo. O crescimento micelial foi avaliado através de medição diária do diâmetro da colônia do fungo, até que o tratamento testemunha atingisse o bordo da placa, em dois eixos diametralmente opostos, com auxílio de régua milimetrada calculando-se a média para cada repetição. Com as médias obtidas foi determinada a porcentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), comparado à testemunha. A PIC foi calculada através da aplicação da seguinte fórmula, descrita por Bastos (1997):

$$\text{PIC} = \frac{(\text{Crescimento Testemunha} - \text{Crescimento Tratamento}) \times 100}{\text{Crescimento Testemunha}}$$

Também foi calculado o Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) através da fórmula descrita por Oliveira (1991), onde D = diâmetro médio atual da colônia, D_a = diâmetro médio da colônia do dia anterior, N = número de dias de avaliação.

$$\text{IVCM} = \frac{\sum (D - D_a)}{N}$$

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado em esquema fatorial, representado pelos indutores em diferentes concentrações (9 indutores x cinco concentrações), com cinco repetições para cada tratamento. Cada placa de Petri contendo as colônias foi considerada uma repetição. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, e as médias quando significativas comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para os dados de PIC o efeito das doses de cada tratamento foi analisado por regressão, quando significativo. O software utilizado para as análises foi o ASSISTAT 7.7 versão beta (SILVA, 2009). Para análise, os dados de porcentagem foram transformados com a adição de uma constante ($x = x_0 + C$, onde x = valor transformado, x_0 = valor real e C = constante).

4.2 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO.

O experimento foi conduzido na casa de vegetação da Universidade Estadual de Ponta Grossa. Foram semeadas em vasos de um litro de volume com substrato vegetal três sementes de milho da variedade IPR 164. A variedade apresenta como características grãos amarelos de textura semi-duro, ciclo precoce, tolerância ao acamamento e quebramento de plantas, porte baixo, ampla adaptação e boa capacidade produtiva. Com relação à resistência a doenças apresenta-se como medianamente resistente à fusariose (agente), *Puccinia sorghi*, mancha de phaeosphaeria (*Phaeosphaeria maydis* (Henn.) Rane.), enfezamento, mancha de cercospora (*Cercospora zeae-maydis* Tehon & Daniels) e às doenças do colmo (antracnose (*C. graminicola*), podridão de diplodia (*Stenocarpella* sp.) (CRUZ et al., 2014).

Após a emergência das plântulas foi realizado o raleio para que restassem apenas duas plantas por vaso. O delineamento experimental utilizado foi o de blocos inteiramente casualizados com cinco repetições, considerando cada vaso uma repetição. Os tratamentos utilizados foram os produtos testados previamente *in vitro* e que proporcionaram a maior porcentagem de inibição do crescimento micelial do fungo *C. graminicola*, mais um indutor de resistência utilizado comercialmente e uma testemunha (Tabela 1).

A pulverização dos produtos dos respectivos tratamentos foi realizada 12 dias após a emergência (BALMER et al, 2013), quando as plantas de milho atingiram o estágio fenológico V4. Após 72 horas da aplicação dos tratamentos foi feita a pulverização da suspensão de esporos de *C. graminicola* (VALÉRIO et al, 2005).

Para obtenção da suspensão de esporos foi utilizada uma colônia em placa de Petri multiplicada em meio de aveia com o fungo *C. graminicola* completamente desenvolvido e esporulado, caracterizada pela presença de coloração alaranjada. Sobre a colônia foi adicionado 10 mL de água destilada e esterilizada e com auxílio de um pincel de cerdas macias foi realizada a raspagem superficial. A suspensão foi filtrada em um pedaço fino de algodão e teve sua concentração de conídios determinada com auxílio de uma câmara de Neubauer e ajustada para 10^6 conídios mL⁻¹.

Tabela 1. Tratamentos e dosagem utilizados para controle de *Colletotrichum graminicola* em plantas de milho (*Zea mays*) em casa de vegetação. Ponta Grossa, PR, 2015.

Tratamentos	Dose (ppm ou g ha ⁻¹)
<i>Ascophyllum nodosum</i>	1.000
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1
<i>Bacillus subtilis</i>	1
Fosfito de Manganês	1.000
Fosfito de Potássio	1.000
Fertilizante NK (High Roots®)	100
Fertilizante NK (Maxi Flor®)	1.000
Cálcio	1.000
Manganês, zinco e molibdênio	1.000
Acibenzolar-S-metílico	15
Testemunha	-

Após ajustada a concentração, a suspensão foi transferida para pulverizador manual de plástico para pulverização nas plantas de milho até o ponto de escorimento. Depois de pulverizadas, as plantas foram mantidas na casa de vegetação em câmara úmida e escura com auxílio de um saco plástico (Figura 3) por um período de 24 horas, com intuito de viabilizar a germinação dos esporos e a infecção (CARVALHO et al., 2013). Após esse período, as plantas foram dispostas em uma bancada na casa de vegetação, onde permaneceram por todo o período de avaliação.

A avaliação da severidade da doença nas folhas de milho foi determinada a cada dois dias em todas as folhas das plantas, após aparecimento dos primeiros sintomas através da adaptação da escala diagramática proposta por Lazaroto et al. (2012) (Apêndice 1) e corresponderam aos 10, 12, 15, 17 e 20 dias após a inoculação (DAI) do patógeno *C. graminicola*.

A partir dos dados de severidade foi calculada a Área Abaixo da Curva de Progresso da Doença (AACPD), de acordo com Shaner e Finny (1977), como mostra a equação abaixo.

$$AACPD = \sum_{i=0}^{n-1} [(y_i + y_{i+1}) / 2] \times (t_{i+1} - t_i)$$

Onde: n é o número de avaliações;

y a intensidade de doenças;

t o tempo quando da avaliação da intensidade da doença;
i e i+1 representam as observações de 1 a n.

Também foi avaliada a frequência de infecção, contando-se o número de lesões por área nas folhas (lesões cm^{-2}). Foi utilizado um pedaço de papel cartão onde foi cortado um quadrado de 1,5 x 1,5 cm para determinação do número de lesões por cm^2 (Anexo 1) e com os dados obtidos foi calculado o número de lesões para a área de 1 cm^2 . A contagem ocorreu em 3 porções de cada folha de milho, uma próxima da base da folha, outra na porção central e a última na ponta da folha, gerando média por folha que posteriormente foi utilizada para determinação da área abaixo da curva de frequência de infecção.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias quando significativas comparadas pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade com auxílio do software Assistat versão 7.7 beta (SILVA; AZEVEDO, 2009). Para análise os dados de porcentagem foram transformados com a adição de uma constante ($x = x_0 + C$, onde x = valor transformado, x_0 = valor real e C = constante).



Figura 3. Câmara úmida e escura para viabilização de germinação de esporos e infecção de *Colletotrichum graminicola* inoculado em plantas de milho (*Zea mays*) em casa de vegetação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXPERIMENTOS *in vitro*

Os experimentos *in vitro* consistiram em avaliar o efeito dos produtos testados como tratamentos no crescimento micelial do patógeno *C. graminicola* incorporando-os no meio de cultura de aveia em placas de Petri. O período de avaliação do crescimento micelial durou seis dias para os dois experimentos. A interação dos produtos com as doses foi significativa tanto para PIC (Tabela 2) quanto para o IVCN (Tabela 3).

Nos experimentos 1 e 2, o tratamento com *Bacillus subtilis* inibiu em 100% o crescimento micelial de *C. graminicola* nas quatro concentrações (1, 10, 100 e 1000 ppm), demonstrando ser o melhor dentre os tratamentos utilizados (Tabela 2). No segundo experimento, em duas das cinco repetições da concentração 1000 ppm, o fungo apresentou desenvolvimento de micélio aéreo somente na superfície do disco que foi repicado (Figura 4), não desenvolvendo hifas no meio de cultura com o tratamento.

Petatán-Sagahón et al. (2011), ao avaliarem a atividade antifúngica de *B. subtilis* sobre o desenvolvimento de *Stenocarpella maydis* e *Stenocarpella macrospora in vitro*, observaram porcentagem de inibição de crescimento micelial de 96,5 e 84,3%, para os fungos respectivamente, com resultado semelhante ao encontrado neste trabalho com *C. graminicola*.

Muis e Quimio (2006) ao avaliarem a difusão e a volatilidade de metabólitos tóxicos de *Bacillus* spp. em meio de cultura sobre o desenvolvimento de *Rhizoctonia solani* puderam comprovar a efetividade da produção de compostos tóxicos pela bactéria pela formação de halos de inibição durante o crescimento micelial do fungo. Também concluíram que além da difusão destes metabólitos no meio de cultura, a bactéria libera no meio compostos voláteis que agem como inibidores do crescimento micelial, pois as colônias apresentaram redução em seu diâmetro quando comparadas à testemunha em testes de volatilidade.

Tabela 2. Porcentagem de inibição de crescimento micelial (PIC) de produtos alternativos *in vitro* sobre *Colletotrichum graminicola* em diferentes concentrações. Ponta Grossa, PR, 2015.

Tratamentos		Dose (PPM)			
		1	10	100	1000
Experimento 1	<i>Ascophyllum nodosum</i>	5,94 de*	8,64 cde	8,41 de	12,29 de
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	92,8 ₆ b	92,49 b	92,13 b	86,65 b
	Fosfito de manganês	8,40 d	7,67 cde	10,00 d	100,00 a
	Fosfito de potássio	23,0 ₃ c	11,80 c	9,49 d	26,56 c
	Fertilizante NK (High Roots®)	7,32 de	7,56 de	19,42 c	9,35 e
	Fertilizante NK (Maxi Flor®)	3,40 e	4,98 e	5,08 e	14,10 d
	Cálcio	8,64 d	8,17 cde	9,14 de	13,25 de
	<i>Bacillus subtilis</i>	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	Manganês, zinco e molibdênio	4,65 de	8,15 cde	12,58 d	86,29 b
	C.V. = 6,83%	1	10	100	1000
Experimento 2	<i>Ascophyllum nodosum</i>	8,31 c	9,27 c	10,00 cde	6,50 f
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	61,8 ₅ b	70,94 b	69,21 b	49,12 d
	Fosfito de manganês	6,87 c	10,42 c	14,08 c	100,00 a
	Fosfito de potássio	7,83 c	9,04 cd	7,70 de	89,33 b
	Fertilizante NK (High Roots®)	8,65 c	10,30 c	10,16 cde	6,11 f
	Fertilizante NK (Maxi Flor®)	8,77 c	10,43 c	11,18 cd	31,35 e
	Cálcio	5,71 c	3,03 d	4,03 e	46,39 d
	<i>Bacillus subtilis</i>	100,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a
	Manganês, zinco e molibdênio	9,16 c	9,67 cd	13,21 cd	70,06 c
C.V. = 10,75%					

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância; C.V. = Coeficiente de variação.

Dentre os compostos produzidos por *B. subtilis* encontram-se enzimas líticas (quitinases, proteases e celulasas), antibióticos e compostos voláteis que possuem capacidade de alterar a estrutura de diversos fungos fitopatogênicos. Como exemplo de antibióticos encontram-se o iturim A e surfactina (efetivo contra *Botrytis cinerea* e *R. solani*), bacillomicina D (controla *Aspergillus flavus*) e a micosubtilina (controla *Pythium aphanidermatum*). Cianeto de hidrogênio, aldeídos, álcoois, quitonas e sulfídeos estão entre os representantes dos compostos voláteis que são produzidos pela bactéria e que podem causar deformação estrutural em diversos fungos fitopatogênicos (MAHESHWARI, 2013).

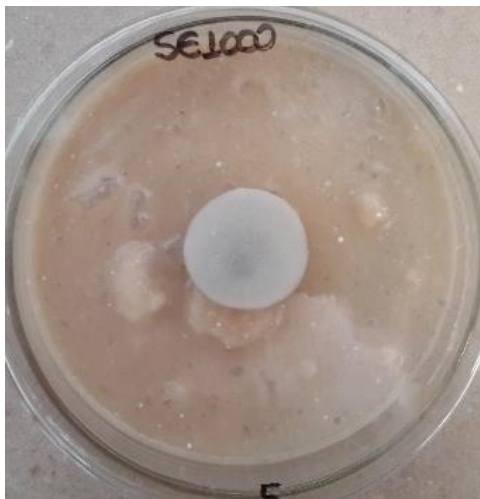


Figura 4. Crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola* apenas no disco de repicagem, não atingindo o meio de cultura de aveia com o tratamento *Bacillus subtilis* na concentração de 1000 ppm.

O tratamento com *B. thuringiensis* também apresentou PIC alta, com redução igual ou acima de 86,65% nas concentrações testadas, não ocorrendo diferença entre as concentrações no primeiro experimento (Tabela 2). Porém, para o segundo teste, sua efetividade de inibição não foi semelhante, apresentando PIC menor, com 61,85%, 70,94%, 69,21% e 49,12% nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ppm, respectivamente.

Maheshwari (2013) afirma que *B. thuringiensis*, assim como outras bactérias do mesmo gênero, produz o antibiótico zwittermicina A, que pode controlar *Phytophthora* sp. Além deste, também produz outros tipos de toxinas, como ácido butírico, cianeto, exotoxinas e sulfato de hidrogênio, porém não apresentam tanta efetividade no controle de fungos fitopatogênicos. Apesar disso, possui alto poder de controle contra nematóides.

O tratamento fosfito de manganês na concentração de 1000 ppm mostrou-se estatisticamente semelhante ao *B. subtilis*, com 100% de inibição de crescimento micelial nos dois experimentos (Tabela 2). No segundo experimento, o tratamento fosfito de potássio na dose 1000 ppm apresentou-se como o segundo melhor tratamento, com PIC de 89,33%, resultado diferente do primeiro experimento, onde não atingiu 30%. Este fato demonstra falta de confiabilidade na resposta para este tratamento, havendo a necessidade de se fazer um novo teste a fim de confirmar a dubiedade dos resultados. Santos (2008), ao avaliar o efeito de fosfito de potássio sobre o crescimento micelial de *Bipolaris sorokiniana* *in vitro* encontrou resultados intermediários de inibição

aos encontrados neste trabalho, 59,3% para uma das marcas comerciais utilizadas e 64,5% para outra, ambas nas concentrações de 1000 ppm.

Araújo et al. (2010), ao avaliar a influência de fosfito de potássio sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* observaram que a diferença de pH do meio BDA após incorporação do tratamento influenciou na inibição do crescimento da colônia, os tratamentos que apresentaram pH em torno de 3,0 foram os que tiveram maior porcentagem de inibição e pH em torno de 7,0 apresentaram inibição próxima a 50%. Também constataram que a concentração de fosfito na formulação foi outro fator que influenciou na inibição do crescimento micelial, pois quanto maior a concentração (formulação 40-20) maior a porcentagem de inibição, acima de 90% e a formulação com a menor concentração de fosfito (formulação 20-20) apresentou PIC próxima de 50%.

Os micronutrientes manganês, zinco e molibdênio na dose 1000 ppm apresentaram PIC de 86,29 e 70,06% no primeiro e segundo experimento, respectivamente. Chahal e Rawla (1980) ao avaliarem a influência de micronutrientes e compostos orgânicos no crescimento de *Penicillium crustosum* Thorn *in vitro* concluíram que compostos como Fe (0,01 ppm), Zn (100 ppm), Cu (0,0001-0,001 ppm), Mo (0,001 ppm) entre outros compostos (orgânicos) são essenciais para o desenvolvimento do fungo nas respectivas concentrações citadas e que o aumento nessa dosagem inibe progressivamente o crescimento de hifas, assim como a sua deficiência. Tal efeito pode ser correlacionado com o resultado obtido para o fungo *C. graminicola* no presente experimento. Os autores observaram também que os nutrientes Mn, Ca e Co não são requeridos para um normal desenvolvimento do fungo.

Com relação ao índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), os tratamentos apresentaram um padrão semelhante a PIC (Tabela 3), onde os tratamentos que apresentaram menores valores foram os mesmo que apresentaram uma maior inibição do crescimento micelial. Apesar disso, alguns tratamentos apresentaram IVCM maiores que os da testemunha (dose 0 ppm), demonstrando, assim, que ao invés de retardarem o crescimento micelial de *C. graminicola* eles o estimularam. Os tratamentos que apresentaram tal efeito foram *Ascophyllum nodosum* na concentração 1 ppm no experimento 1 e com

1, 10, 100 e 1000 ppm no experimento 2; fosfito de manganês na concentração 10 ppm no experimento 1 e na concentração 1, 10 e 100 ppm no experimento 2; fosfito de potássio nas concentrações 1, 10 e 100 ppm no experimento 2; fertilizante NK (Maxi Flor®) com 1, 10 e 100 ppm no experimento 1 e 10 e 100 ppm no experimento 2, além dos micronutrientes manganês, zinco e molibdênio na concentração 1 ppm no experimento 1 e nas concentrações 1, 10 e 100 ppm no experimento 2.

Em experimento com bioautografia direta, Peres et al. (2012) avaliaram o efeito de extratos de diversas algas marinhas, incluindo *A. nodosum*, sobre o desenvolvimento de *Colletotrichum lagenarium*, agente causal da antracnose em curcubitáceas. Em seu estudo concluíram que dentre os componentes encontrados nos extratos de *A. nodosum* e de outras algas os terpenos foram responsáveis pela interferência no desenvolvimento do fungo nas dosagens 10, 25, 50, 150 e 250 mg. Talvez as concentrações destes compostos nas doses utilizadas no presente trabalho não foram suficientes para atingir tal efeito fungitóxico/fungistático.

Moreira et al. (2014), ao avaliar o efeito de *B. subtilis* (Serenade®) sobre o IVC de *Colletotrichum acutatum* *in vitro* concluíram que o efeito inibitório significativo causado pela bactéria foi devido às toxinas termoeestáveis produzidas no meio, pois ao testarem o seu efeito volátil não encontraram diferenças significativas com a testemunha.

Com os dados das médias de PIC das doses foram feitas as curvas de regressão para os tratamentos que foram significativos (Figura 5), para os experimentos 1 e 2.

Bacillus subtilis e *B. thuringiensis* foram os únicos tratamentos que não foram significativos pela análise de regressão para ambos os experimentos. No experimento 1, os tratamentos com *A. nodosum* e cálcio se comportaram de forma linear, onde com o aumento na dose aumentou a PIC (Figura 5). Já para os demais tratamentos, as curvas se comportaram de forma quadrática, com picos de inibição na dose próxima a 500 ppm para o tratamento fertilizante NK (High Roots®) e 1000 ppm para os outros tratamentos (Figura 5).

No experimento 2 todos os tratamentos significativos apresentaram-se de forma quadrática, com máximo de PIC em torno de 450 ppm para os

tratamentos *A. nodosum* e fertilizante NK (High Roots®) e 1000 ppm para os demais (Figura 6).

Tabela 3. Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Colletotrichum graminicola* submetido ao efeito de produtos alternativos em diferentes concentrações *in vitro*. Ponta Grossa, PR, 2015.

Tratamentos		Dose (ppm)			
		1	10	100	1000
Experimento 1	<i>Ascophyllum nodosum</i>	13,70 ab*	13,33 ab	13,37 a	12,83 ab
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	0,80 d	0,85 c	0,90 d	2,65 d
	Fosfito de manganês	13,37 ab	13,45 ab	13,13 ab	0,00 e
	Fosfito de potássio	11,37 c	12,83 b	12,88 ab	10,88 c
	Fertilizante NK (High Roots®)	13,33 b	13,07 ab	11,77 c	12,98 ab
	Fertilizante NK (Maxi Flor®)	13,73 ab	13,63 a	13,42 a	12,27 b
	Cálcio	13,17 ab	13,30 ab	13,20 ab	12,50 ab
	<i>Bacillus subtilis</i>	0,00 e	0,00 d	0,00 e	0,00 e
	Manganês, zinco e molibdênio	13,78 a	13,00 b	12,68 b	2,70 d
	CV = 3,02%	1	10	100	1000
Experimento 2	<i>Ascophyllum nodosum</i>	11,33 ab	11,15 ab	11,07 bc	12,28 a
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	4,53 d	3,40 d	4,15 d	5,59 e
	Fosfito de manganês	11,13 ab	11,15 ab	11,35 ab	0,00 h
	Fosfito de potássio	11,98 a	11,90 a	12,02 a	0,45 g
	Fertilizante NK (High Roots®)	11,12 b	11,12 ab	11,12 bc	10,85 b
	Fertilizante NK (Maxi Flor®)	11,00 bc	11,12 ab	11,38 ab	8,98 c
	Cálcio	10,22 c	10,12 c	10,32 c	7,15 d
	<i>Bacillus subtilis</i>	0,00 e	0,00 e	0,00 e	0,00 h
	Manganês, zinco e molibdênio	11,37 ab	11,47 ab	11,57 ab	2,70 f
	CV = 4,84%				

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey à 5% de significância; CV = Coeficiente de variação.

As Figuras 7 e 8 mostram a comparação do diâmetro das colônias de cada tratamento nas concentrações 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm ao sexto dia de avaliação, período em que alguns tratamentos e a testemunha atingiram o bordo das placas de Petri.

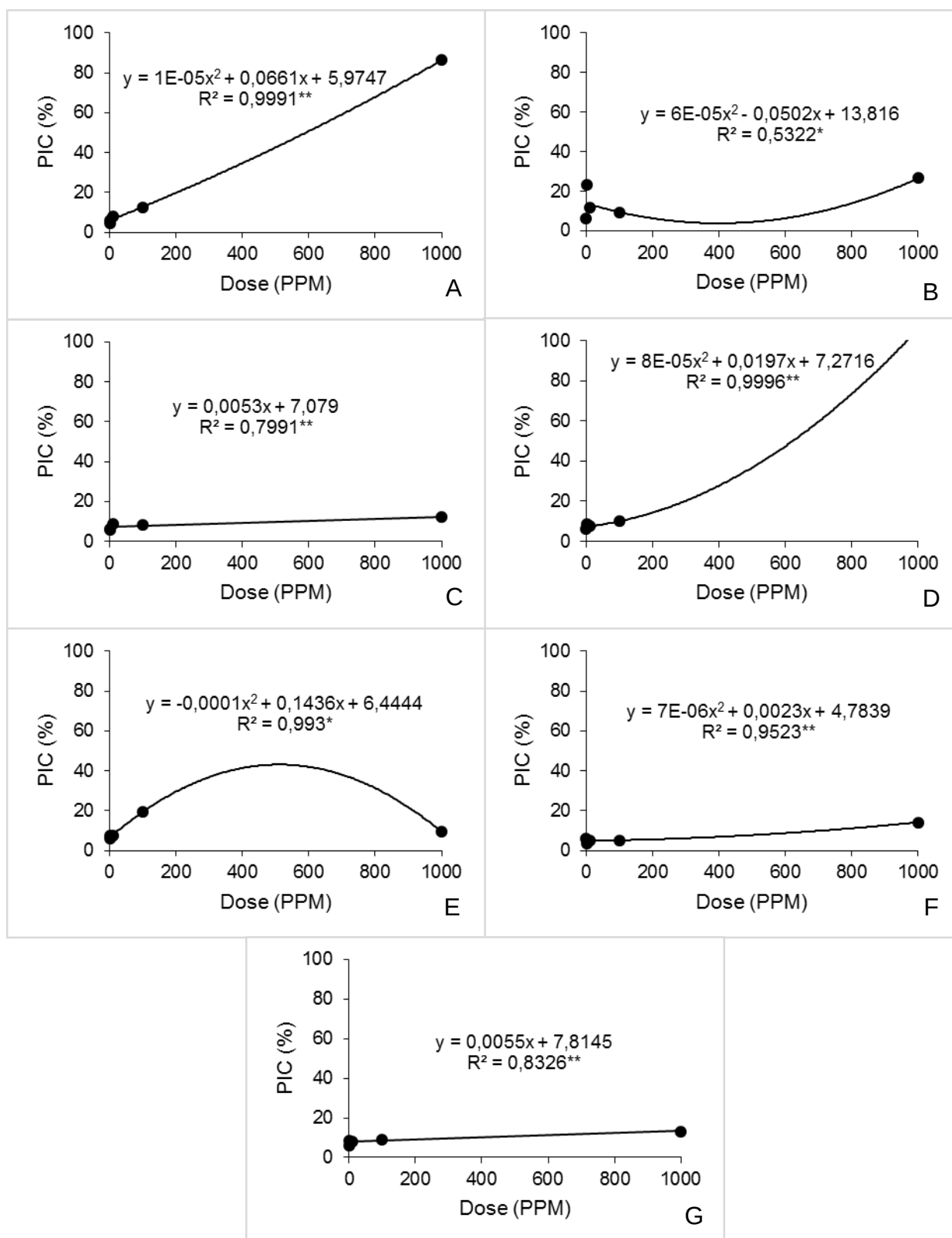


Figura 5. Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC) *in vitro* de *Colletotrichum graminicola* submetidos a diferentes tratamentos nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm, experimento 1. Manganês, Zinco e Molibdênio (A); Fosfito de Potássio (B); *Ascophyllum nodosum* (C); Fosfito de Manganês (D); Fertilizante NK (High Roots®) (E); Fertilizante NK (Maxi Flor®) (F); Cálcio (G); *significativo ao nível de 5% de probabilidade; **significativo ao nível de 1% de probabilidade.

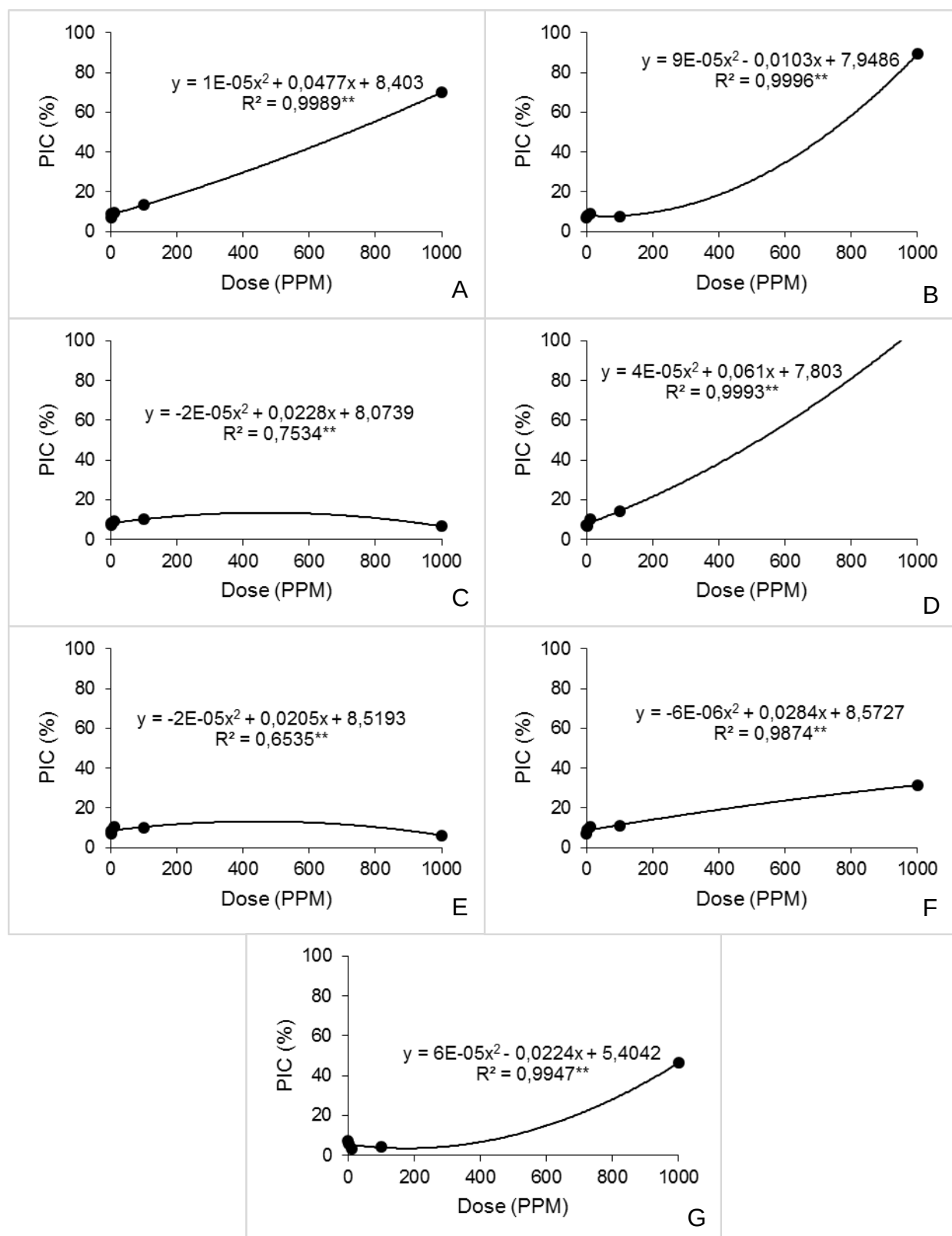


Figura 6. Porcentagem de Inibição de Crescimento Micelial (PIC) *in vitro* de *Colletotrichum graminicola* submetidos a diferentes tratamentos nas concentrações de 0, 1, 10, 100 e 1000 ppm, experimento 2. Manganês, Zinco e Molibdênio (A); Fosfito de Potássio (B); *Ascophyllum nodosum* (C); Fosfito de Manganês (D); Fertilizante NK (High Roots®) (E); Fertilizante NK (Maxi Flor®) (F); Cálcio (G); *significativo ao nível de 5% de probabilidade; **significativo ao nível de 1% de probabilidade.

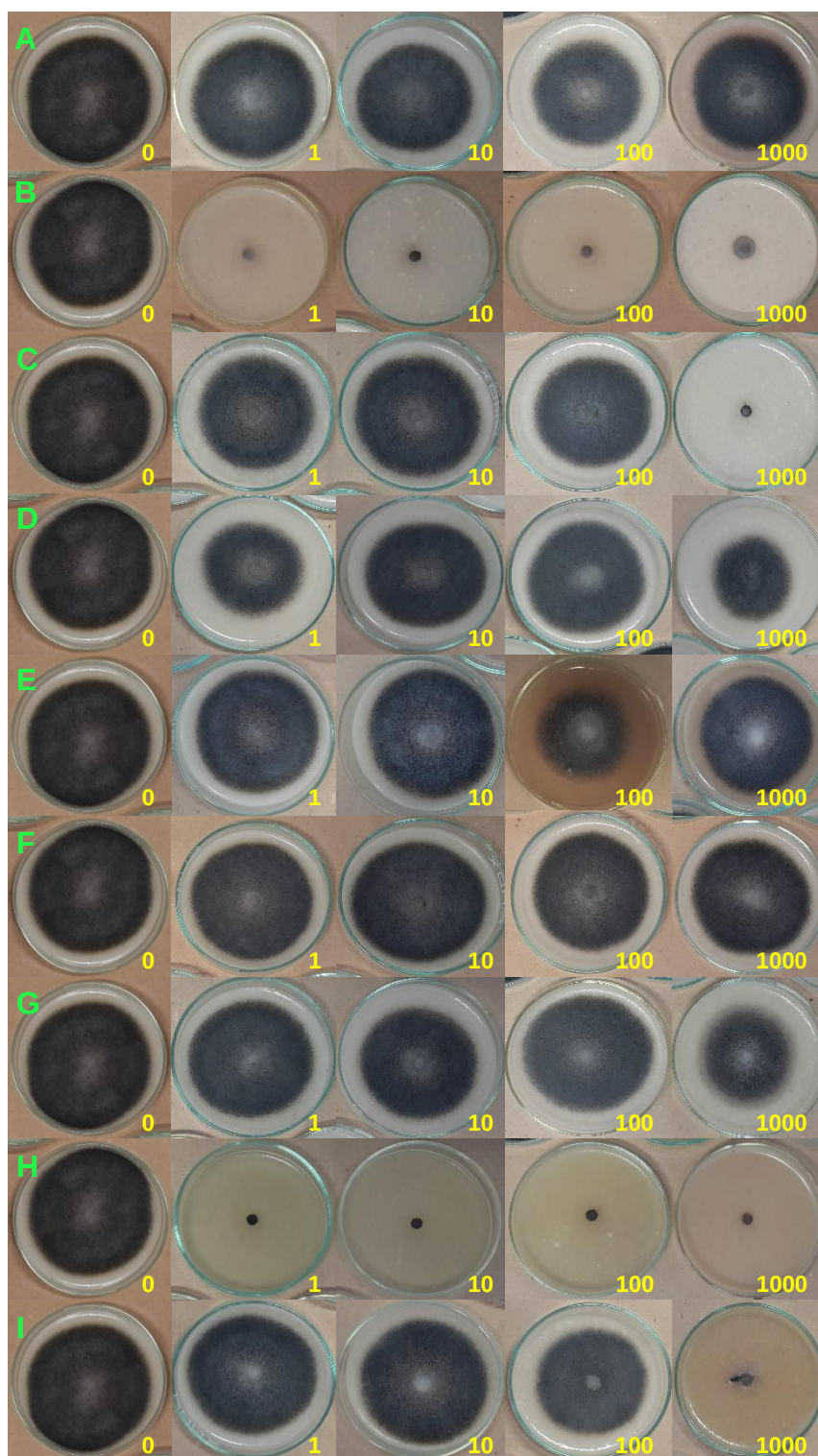


Figura 7. Colônias de *Colletotrichum graminicola* (Experimento 1) com seis dias de idade com incorporação dos tratamentos no meio de cultura nas doses 0, 1, 10, 100 e 1.000 ppm. *Ascophyllum nodosum* (A); *Bacillus thuringiensis* (B); fosfato de manganês (C); fosfato de potássio (D); fertilizante NK (High Roots®) (E); cálcio (F); fertilizante NK (Maxi Flor®) (G); *Bacillus subtilis* (H); manganês, zinco e molibdênio (I).

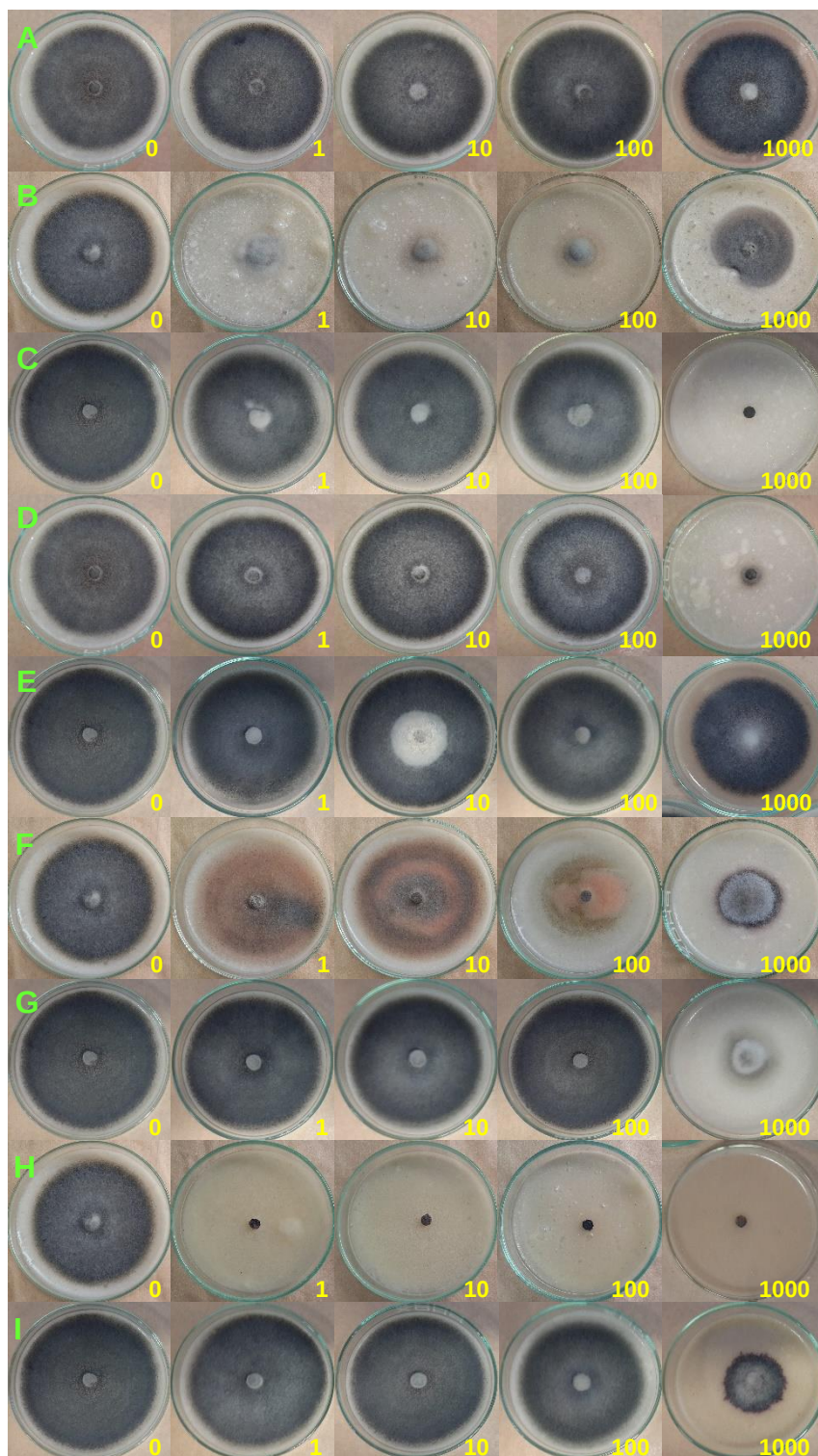


Figura 8. Colônias de *Colletotrichum graminicola* (Experimento 2) com seis dias de idade com incorporação dos tratamentos no meio de cultura nas doses 0, 1, 10, 100 e 1.000 ppm. *Ascophyllum nodosum* (A); *Bacillus thuringiensis* (B); fosfito de manganês (C); fosfito de potássio (D); fertilizante NK (High Roots®) (E); cálcio (F); fertilizante NK (Maxi Flor®) (G); *Bacillus subtilis* (H); manganês, zinco e molibdênio (I).

5.2 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Aos 10 DAI, os tratamentos que apresentaram menor severidade da doença foram o composto de micronutrientes manganês, zinco e molibdênio e o acibenzolar-S-metílico (ASM) com média de 7,19 e 7,73% respectivamente (Tabela 4). O tratamento que apresentou maior severidade foi o fertilizante NK (Maxi Flor®), com uma média de 19,29%. Os demais tratamentos e a testemunha apresentaram valores intermediários, não diferindo estatisticamente dos demais, com médias variando de 10,23% (fertilizante NK – High Roots®) a 16,65% (fosfito de manganês).

Na segunda avaliação, aos 12 DAI (Tabela 4), os tratamentos apresentaram uma variação maior de severidade, para alguns a doença progrediu e para outros permaneceu estabilizada. Novamente, o tratamento que apresentou menor severidade foi o ASM, com média de 9,30%, seguido dos tratamentos fosfito de potássio e *B. thuringiensis*, com 11,46 e 13,62% respectivamente. Nenhum dos tratamentos diferiu da testemunha, que apresentou média de 14,36% de severidade. Nas demais avaliações os valores de severidade dos tratamentos e da testemunha tenderam a se igualar, demonstrando, dessa forma, a progressão da doença decorrente da não efetividade dos tratamentos para esse período. Na Figura 9 é demonstrada essa evolução da severidade da doença por tratamento em função dos períodos de avaliação no tempo.

Araújo e Menezes (2009), ao avaliarem o efeito de indução de resistência de *B. subtilis* (pulverização foliar e por aplicação ao solo) e de ASM em plantas de tomate em casa de vegetação observaram que a aplicação foliar de *B. subtilis* e ASM não foi eficiente no controle das doenças incidentes. Porém, quando aplicado ao solo, *B. subtilis* diminuiu significativamente a severidade das doenças quando comparado à testemunha, indicando uma resistência induzida de natureza sistêmica.

Barros (2011), ao avaliar o efeito de ASM para controle de manchas foliares em geral em plantas de milho em condições de campo, diferentemente dos resultados obtidos neste experimento, não encontrou diferença significativa entre a AACPD e a testemunha. Tal fato foi justificado pela necessidade da aplicação do produto ser em um período anterior ao da infecção dos patógenos

na planta para que haja resposta, o que não pode ser controlado em condições de campo, e também pela necessidade da manutenção das plantas elicítadas, exigindo uma reaplicação de ASM, fato que não ocorreu em seu experimento.

Dias et al. (2010) também não encontraram resultados positivos com a utilização de ASM para diminuição da severidade de manchas foliares em plantas de milho, porém, quando seu uso foi associado à aplicação de fungicidas, o controle de doenças e a produtividade foi melhor até para os tratamentos com apenas a aplicação de fungicidas.

Ao avaliarem a indução de resistência causada por *B. thuringiensis* em plantas de tomate contra a murcha bacteriana (*Ralstonia solanacearum*), Takahashi et al. (2014) obtiveram resultados positivos. As plantas que tiveram suas raízes tratadas com *B. thuringiensis* apresentaram resistência contra a bactéria até sete dias após o tratamento e demonstraram induzir a produção de proteínas-PR em todas as partes da planta, como folhas, caule e raízes. Já plantas tratadas por pulverização foliar, apesar de inibirem os sintomas de *R. solanacearum*, apenas induziram a produção de proteínas-PR nas folhas, demonstrando que a aplicação via raízes é muito mais vantajosa.

Segundo Maheshwari (2013), a bactéria *B. thuringiensis*, mais utilizada como inseticida, induz o acúmulo de proteínas PR em plantas de café, reduzindo a incidência e severidade de *Hemilea vastatrix*. Ainda segundo o mesmo autor, em plantas de milho, *B. thuringiensis* possui capacidade de indução de resistência contra podridões de colmo causadas por *Erwinia carotorovora*, pois suprime a percepção de quorum (quorum sensing) de virulência do patógeno, mecanismo de comunicação entre as bactérias que determinam a patogenicidade.

Com relação à área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) o único tratamento que diferiu estatisticamente da testemunha foi o ASM com 96,58% de redução. Porém, os tratamentos *A. nodosum*, *B. thuringiensis*, fertilizante NK (High Roots®), cálcio, *B. subtilis* e Mn, Zn e Mo, apesar de não diferirem da testemunha, foram semelhantes estatisticamente ao ASM.

Nesi et al. (2013) avaliaram o efeito de indução de resistência de *A. nodosum* em variedades de morango sobre a expressão de sintomas de *Mycosphaerella fragariae*, causador de manchas foliares na planta. Os autores concluíram que a aplicação do extrato de alga não foi eficiente no controle da

doença, resultado que se assemelha ao encontrado no presente trabalho. Já Uppal et al. (2008) encontraram resultados diferentes ao testarem o efeito da aplicação de *A. nodosum* (Acadian®) em plantas de batata contra murcha de *Verticilium*. Os autores constataram que tanto a aplicação via semente, como a incorporação do tratamento no solo diminuíram a incidência e a severidade da doença nas plantas em condições controladas.

Avaliando a interação de adubação com N e K₂O no controle de *C. graminicola* em plantas de milho, Carvalho et al. (2013) concluíram que a quantidade de área foliar lesionada (AFL) pelo patógeno é dependente da relação de quantidade entre os dois nutrientes. As menores AFL's foram observadas pelos autores foram constatadas nos tratamentos com a combinação da menor dose de N e maior dose de K e a maior dose de N influenciou na absorção de K. Tal fato pode explicar a diferença na AACPD entre os tratamentos fertilizante NK (High Roots®) com concentração de ingrediente ativo (i.a.) N de 100 ppm e fertilizante NK (Maxi Flor®) com concentração de i.a. N de 1000 ppm, que apesar de não diferirem entre si estatisticamente, apresentaram médias menores e maiores que a testemunha respectivamente, além de o primeiro não diferir estatisticamente do tratamento ASM.

O cálcio reduz a severidade de muitas doenças causadas por patógenos que atacam raiz e colmo, como *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Botrytis*, *Fusarium oxysporum* e o nematóide *Ditylenchus dipsaci*. O efeito do cálcio na resistência às doenças está relacionado ao seu efeito na composição das paredes celulares das células gerando resistência à penetração pelos patógenos (AGRIOS, 2005).

Tabela 4. Severidade (%) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) da antracnose da folha (*Colletotrichum graminicola*) em plantas de milho (*Zea mays*) sob condições de casa de vegetação. Ponta Grossa, PR, 2015.

Tratamentos	Dias após a inoculação de esporos					AACPD
	10	12	15	17	20	
<i>Ascophyllum nodosum</i>	15,45 ab*	13,85 abc	17,17 ab	17,23 ab	18,66 ns	164,04 ab
Acibenzolar-S-metílico	7,73 b	9,30 c	9,62 b	10,37 b	10,41	96,58 b
<i>Bacillus thuringiensis</i>	12,98 ab	13,62 bc	20,41 ab	19,48 ab	18,42	151,44 ab
Fosfito de Manganês	16,65 ab	16,19 abc	21,86 a	20,33 a	16,59	187,49 a
Fosfito de Potássio	12,87 ab	11,46 bc	14,72 ab	15,07 ab	14,22	137,32 ab
Fertilizante NK (High Roots®)	10,23 ab	16,47 abc	17,26 ab	15,27 ab	15,56	156,06 ab
Cálcio	15,45 ab	15,18 abc	16,31 ab	14,04 ab	14,67	151,27 ab
Fertilizante NK (Maxi Flor®)	19,29 a	19,58 ab	20,99 a	17,82 ab	18,70	193,29 a
<i>Bacillus subtilis</i>	12,99 ab	15,71 abc	19,37 ab	16,56 ab	16,65	167,07 ab
Manganês, zinco e molibdênio	7,19 b	15,43 abc	18,36 ab	19,28 ab	16,99	165,35 ab
Cobre, manganês e zinco	12,63 ab	23,38 a	20,31 ab	17,19 ab	16,86	190,12 a
Testemunha	14,36 ab	16,46 abc	18,23 ab	18,64 ab	19,22	176,52 a
C.V. (%)	33,71	28,58	28,41	25,95	27,19	22,46

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância; ns = não significativo; C.V. = coeficiente de variação.

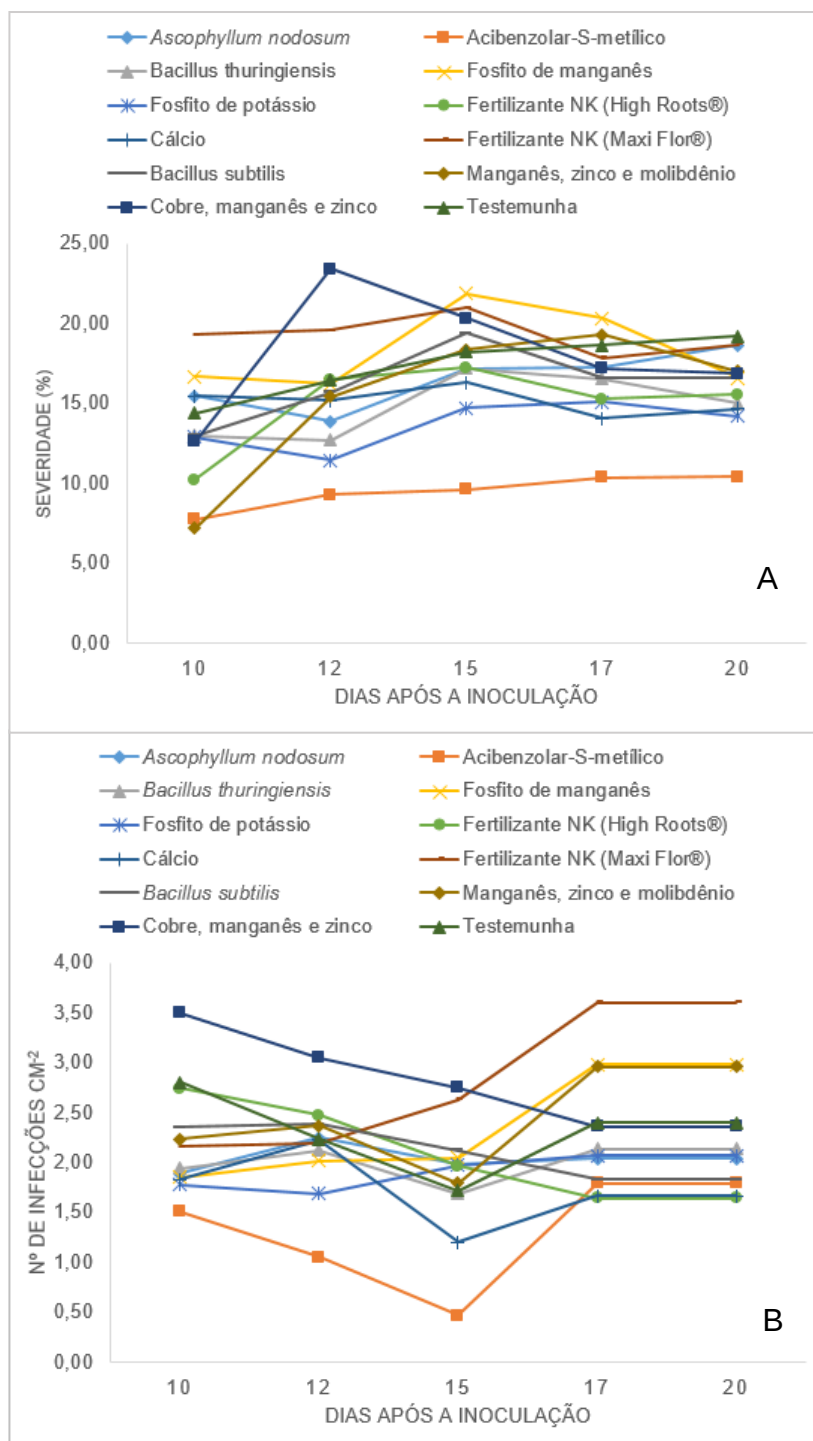


Figura 9. Severidade (%) da antracnose (*Colletotrichum graminicola*) da folha do milho (*Zea mays*) (A) e número de lesões cm⁻² (B) de *C. graminicola* em plantas de milho com a pulverização de diferentes tratamentos em diferentes períodos de avaliação após a inoculação artificial de esporos. Ponta Grossa, PR, 2015.

Avaliando-se o número de lesões cm⁻² de folha pôde-se calcular a área abaixo da curva de frequência de infecção (AACFI) (Tabela 6). O tratamento ASM foi o único a diferir-se estatisticamente da testemunha. No entanto, os

tratamentos fosfito de potássio e cálcio, apesar de não diferirem da testemunha, foram estatisticamente semelhantes ao ASM.

O tratamento fertilizante NK (Maxi Flor®) apresentou a maior AACFI, com 28,65, maior até que a testemunha, demonstrando um estímulo à infecção pelos conídios inoculados, apesar de não ter diferido estatisticamente desta (Tabela 6). É possível perceber a diminuição do número de lesões cm^{-2} de *C. graminicola* até 15 DAI para o tratamento ASM e a semelhança com a testemunha dos demais tratamentos (Figura 9).

Moreira et al. (2014), diferentemente do que ocorreu neste experimento, ao usar o produto comercial Serenade® (*B. subtilis*) obtiveram diferença significativa de AACFI de *C. acutatum* em mudas de maçã sob condições de casa de vegetação. Porém, a dosagem utilizada foi de 40 mL L⁻¹, muito maior que a utilizada neste experimento.

Tabela 5. Número de lesões cm⁻² e área abaixo da curva de frequência de infecção (AACFI) de antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*) em plantas de milho (*Zea mays*) sob condições de casa de vegetação. Ponta Grossa, PR, 2015.

Tratamentos	Dias após a inoculação					AACFI
	10	12	15	17	20	
<i>Ascophyllum nodosum</i>	1,89 ab*	2,25 ab	1,98 ab	2,04 c	2,04 c	20,62 bcd
Acibenzolar-S-metílico	1,51 b	1,06 b	0,47 c	1,79 c	1,80 c	12,49 e
<i>Bacillus thuringiensis</i>	1,94 ab	2,12 ab	1,69 bc	2,14 bc	2,14 bc	20,01 cd
Fosfito de manganês	1,85 ab	2,02 ab	2,02 ab	2,98 ab	2,99 ab	23,96 abc
Fosfito de potássio	1,78 ab	1,69 ab	1,69 bc	2,07 c	2,07 c	19,21 cde
Fertilizante NK (High Roots®)	2,74 ab	2,48 ab	2,48 ab	1,64 c	1,65 c	20,41 cd
Cálcio	1,83 ab	2,22 ab	2,22 ab	1,66 c	1,67 c	17,04 de
Fertilizante NK (Maxi Flor®)	2,16 ab	2,20 ab	2,20 ab	3,60 ab	3,61 a	28,65 a
<i>Bacillus subtilis</i>	2,36 ab	2,38 ab	2,38 ab	1,83 c	1,83 c	20,93 bcd
Manganês, zinco e molibdênio	2,24 ab	2,37 ab	2,37 ab	2,96 ab	2,96 ab	24,48 abc
Cobre, manganês e zinco	3,50 a	3,05 a	3,05 a	2,36 bc	2,37 bc	27,44 ab
Testemunha	2,80 ab	2,23 ab	2,23 ab	2,40 bc	2,40 bc	22,29 abcd
C.V. (%)	35,59	31,13	28,08	17,63	17,59	14,69

*Médias seguidas de mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey à 5 % de significância; C.V. = coeficiente de variação.

6 CONCLUSÃO

6.1 EXPERIMENTO *in vitro*

Os produtos com *B. subtilis* e *B. thuringiensis* foram os que apresentaram maior PIC *in vitro* de *C. graminicola* nos 2 experimentos.

6.2 EXPERIMENTO EM CASA DE VEGETAÇÃO

Acibenzolar-S-metílico foi o único produto a induzir resistência contra a antracnose do milho.

Os demais produtos não foram eficientes como indutores de resistência contra a doença.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. 5th ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 2005. p.922.

ARAÚJO, F. F.; MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e Abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa Phytopathologica**, v. 35, n. 3, p. 169-172, 2009.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M., J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 35, n. 1, p. 54-59, 2010.

BALMER, D.; PAPAJEWSKI, D. V.; PLANCHAMP, C.; GLAUSER, G.; MAUCH-MANI, B. Induced resistance in maize is based on organ-specific defence responses. **The Plant Journal**, v. 74, p. 213–225, 2013.

BARROS, F. C.; SAGATA, E.; FERREIRA, L. C. C.; JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos. **Biosciense Journal**, v. 26, n. 2, p. 231-239, 2010.

BARROS, R. Estudo sobre a aplicação foliar de acibenzolar-s-metil para indução de resistência à ferrugem asiática em soja e cercosporiose em milho. **Arquivos Instituto Biológico**, v. 78, n. 4, p. 519-528, 2011.

BASTOS, C. N. Efeito do óleo de *Piper aduncum* sobre *Crinipelis* e outros fungos fitopatogênicos. **Fitopatologia Brasileira**, v. 22, n. 3, p. 441-3, 1997.

BERGSTROM, G.C.; NICHOLSON, R.L. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management. **Plant Disease**, v. 83, p. 596-608, 1999.

CAMARGO, L. E. A. Genética da interação patógeno-hospedeiro. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. v. 1, 4. ed. São Paulo: Ceres, 2011. cap. 6.p. 119-132.

CARVALHO, D. O.; POZZA, E. A.; CASELA, C. R.; COSTA, R. V.; POZZA, A. A. A.; CARVALHO, C. A. Adubação nitrogenada e potássica na severidade da antracnose em dois cultivares de milho. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 60, n.3, p. 380-387, 2013.

CHAHAL, S. S.; RAWLA, G. S. Influence of trace elements and organic growth factors on the growth of *Penicillium crustosum* Thorn. **Prec. Indian Aead. Sci.**, v. 89, n. 3, p. 301-306, 1980.

CONAB. Nº 12, Décimo segundo levantamento – setembro. **Acompanhamento da safra brasileira – grãos**, v.2 - SAFRA 2014/15 N.2 - Segundo Levantamento – Intenção de Plantio. Novembro/2014. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_11_11_08_50_51_boletim_graos_novembro_2014.pdf> Acesso em: 05 mar. 2015.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; QUEIROZ, L. R. Milho - Cultivares para 2013/2014. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas – MG, 2014. Disponível em: < <http://www.cnpms.embrapa.br/milho/cultivares/>> Acesso em: 11 nov. 2015.

DIAS, A. R.; BORGES, E. P.; GUAZINA, R. A.; OLIVEIRA, J. A. R.; FERREIRA, C. B.; BORGELT, L.; ABREU, A. B. L. Indutores de Resistência e Fungicidas na Cultura do Milho na Região dos Chapadões Alfredo. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2010.

EYLES, A.; BONELLO, P.; GANLEY, R.; MOHAMMED, C. Induced resistance to pests and pathogens in trees. **New Phytologist**, v. 185, p. 893-908, 2010.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Produção de milho**. 2. Ed. Guaíba: Agropecuária. 360 p., 2004.

FIGUEIREDO, J. E. F.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W.; PINTO, N. F. J.; CASELA, C. R. Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In: XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo, 2010, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Faculdade de Ciências Agrônomicas, 2010.

GOODMAN, M. M. História e origem do milho. In: PATERNIANI, E. (Coord.) **Melhoramento e produção do milho no Brasil**. Ed. Marprint, Piracicaba, 1978. P. 1-18.

IBGE. Levantamento Sistemático de Produção Agrícola. Rio de Janeiro, v.29 n.4 p.1-81, 2015. Disponível em: < [ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_\[mensal\]/Fasciculo/Ispa_201506.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/Ispa_201506.pdf)> Acesso em: 10 jun. 2015.

JAMIL, F.; NICHOLSON, R. L. Cultural studies on *Colletotrichum graminicola* isolates from shattercane, sorghum and corn. **Mycological Research**, v. 93, n. 1, p. 63-66, 1989.

KESSMAN, H.; STAUB, T.; HOFFMAN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção**. Piracicaba, 2007, 140p. Tese

(Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura. “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2007.

LAZAROTO, A.; SANTOS, I.; KONFLANZ, V. A.; MALAGI, G.; CAMOCHENA, R. C. Escala diagramática para avaliação de severidade da helmintosporiose comum em milho. **Ciência Rural**, v. 42, n. 12, p. 2131-2137, 2012.

MAHESHWARI, D. K. (Ed.). **Bacteria in Agrobiolgy: Disease Management**. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 2013. 495 p.

MARCELO, A. V.; CORÁ, J. E.; FERNANDES, C.; MARTINS, M. R.; JORGE, R. F. Crop sequences in no-tillage system: Effects on soil fertility and soybean, maize and rice yield. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 33, p. 417-428, 2009.

MARGIS-PINHEIRO, M.; SANDRONI, M.; LUMMERZEIM, M.; OLIVEIRA, D. A. Defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 147, p. 24-31, 1999.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. **Introdução à Fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2013.

MOREIRA, R. R.; NESI, C. N.; MAY DE MIO, L. L. *Bacillus* spp. and *Pseudomonas putida* as inhibitors of the *Colletotrichum acutatum* group and potential to control *Glomerella* leaf spot. **Biological Control**, v. 72, p. 30-37, 2014.

MUIS, A.; QUIMIO, A. J. Effectiveness of *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn against *Rhizoctonia solani* Kuhn *in vitro*. **Journal Agroland**, v. 13, n. 3, p. 234-239, 2006.

NAYLOR, D.V.; LEONARD, K.J. Survival of *Colletotrichum graminicola* in infected corn stalks in North Carolina. **Plant Disease Reporter**, v. 61, p. 382-383, 1977.

NESI, C. N.; KUHN, T. M. A.; ARAÚJO, E. S.; MÓGOR, A. F.; MAY DE MIO, L. L. Avaliação de extrato de algas no progresso temporal da mancha de *Mycosphaerella* em cultivares de morangueiro. **Revista Ceres**, v. 60, n. 1, p. 38-42, 2013.

NILCHOLSON, R.L.; MORAES, W.B.C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, p. 255-261, 1980.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. In: AMORIN, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds.). **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 4. Ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011, v.1, cap. 35, p. 593-636.

PEREIRA, O. A. P. Doenças do milho. In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.) **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005, v. 2, p. 569-588

PERES, J. C. F.; CARVALHO, L. R.; GONÇALEZ, E.; BERIAN, L. O. S.; FELICIO, J. D. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, n. 3, p. 294-299, 2012.

PETATÁN-SAGAHÓN, I.; ANDUCHO-REYES, M. A.; SILVA-ROJAS, H. V.; ARANA-CUENCA, A.; TELLEZ-JURADO, A.; CÁRDENAS-ÁLVAREZ, I. O.; MERCADO-FLORES, Y. Isolation of Bacteria with Antifungal Activity against the Phytopathogenic Fungi *Stenocarpella maydis* and *Stenocarpella macrospora*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, p. 5522-5537, 2011.

PIERO, R. M. D.; GARDA, M. V. Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

PINTO, N. F. J. A. Controle químico da antracnose (*Colletotrichum graminicola*) do sorgo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 2, n. 3, p. 148-152, 2003.

PINTO, N. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 27, p. 82-94, 2006.

PONTES, M. F. C. **Características fisiológicas e morfológicas de *Colletotrichum graminicola* (Ces) Wils. e avaliação de fontes de resistência em milho (*Zea mays* L.)**. Recife, 1987. 82p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SABATO, E. O.; FERNANDES, F. T. **Doenças do Milho**. SBF. 2014. Disponível em: < <http://www.sbfito.com.br/divulgacao/DoencasdoMilho2.pdf>>. Acesso: 05 mar. 2015.

SANTOS, H. A. A. **Efeito de fosfito no controle de doenças foliares de trigo *in vitro* e *in sito***. Ponta Grossa, 2008, 148 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual de Ponta Grossa.

SCOLARI, D. D. G. Produção agrícola mundial: o potencial do Brasil. **EMBRAPA – CNPTIA**. 2014. Disponível em:<<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/19030/1/Producao-agricola-mundial.pdf>> Acesso em: 04 mar. 2015.

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

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno. **Anais...** Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, R. A.; REIS, V. M.; BALDANI, J. I.; OLIVARES, F. L. Defesa de Plantas contra o Ataque de Fitopatógenos. **EMBRAPA Agrobiologia**, Seropédica, Documentos 250, 56 p., 2008.

SUKNO, S. A.; GARCÍA, V. M.; SHAW, B. D.; THON, M. R. Root Infection and Systemic Colonization of Maize by *Colletotrichum graminicola*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 823-832, 2008.

SUTTON, B. C. **The coelomycetes**. New York: Academic Press, 1980. 696p.

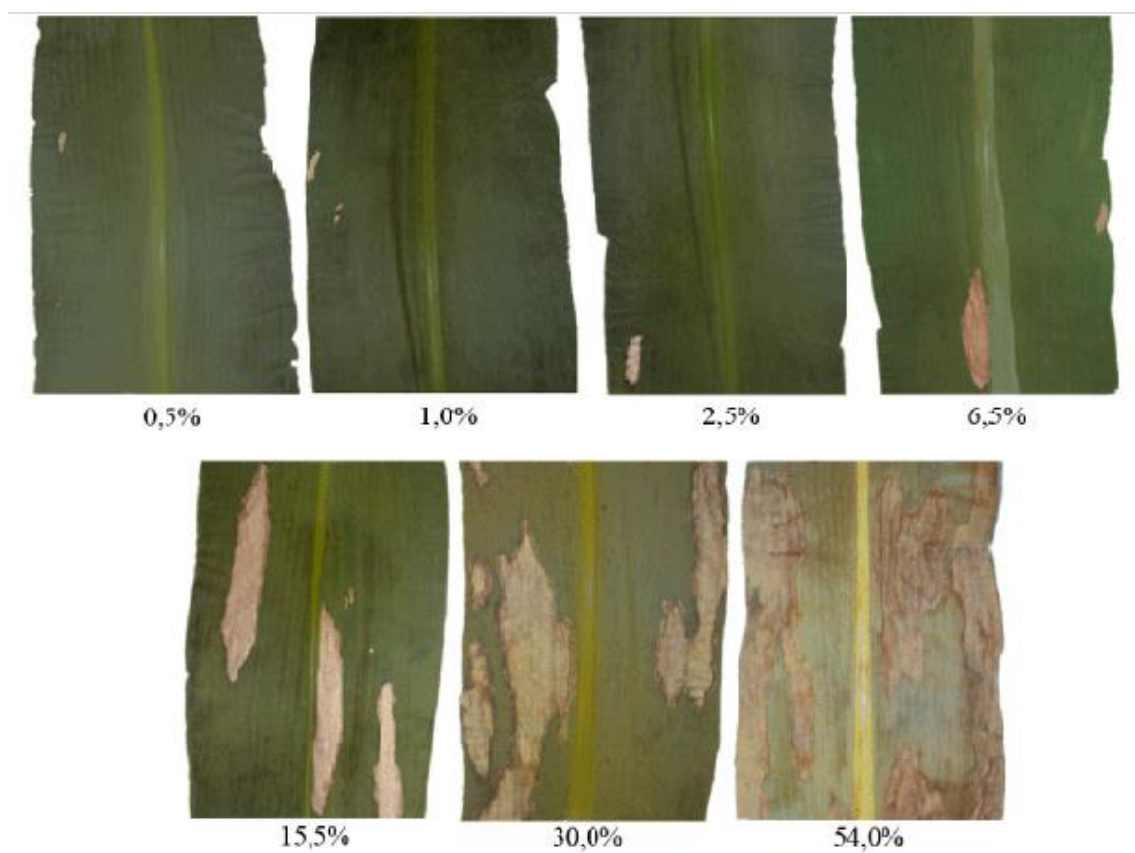
TAKAHASHI, H.; NAKAHO, K.; ISHIHARA, T.; ANDO, S.; WADA, T.; KANAYAMA, Y.; ASANO, S.; YOSHIDA, S.; TSUSHIMA, S.; HYAKUMACHI, M. Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. **Plant Cell Reports**, v. 33, p. 99-110, 2014.

UPPAL, A. K.; EL HADRAMI, A.; ADAM, L. R.; TENUTA, M.; DAAYF, F. Biological control of potato *Verticillium* wilt under controlled and field conditions using selected bacterial antagonists and plant extracts. **Biological Control**, v. 44, p. 90-100, 2008.

VALÉRIO, H. M.; RESENDE, M. A.; WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; CASELA, C. R. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum graminicola* from Brazil. **Mycopathologia**, v. 159, p. 449–459, 2005.

WARREN, H.L. Survival of *Colletotrichum graminicola* in corn kernels. **Phytopathology**, v. 67, p. 160-162, 1977.

8 ANEXOS



Anexo 1. Escala diagramática para avaliação de severidade de helmintosporiose comum em milho (*Exserohilum turcicum*). Valores em percentual de área foliar com sintomas. Fonte: LAZAROTO et al. (2012)

9 APÊNDICES



Apêndice 1. Papel cartão com esquema de quadrado de 1,5 x 1,5 cm para avaliação do número de lesões de *Colletotrichum graminicola* por área em plantas de milho (*Zea mays*).