

Paulo Augusto Garbugio da Silva

**LEVEDURAS PARA O CONTROLE DA HELMINTOSPORIOSE EM
MILHO (*Zea mays*)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero.

Florianópolis

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva , Paulo Augusto Garbugio
LEVEDURAS PARA O CONTROLE DA HELMINTOSPORIOSE EM
MILHO (Zea mays) / Paulo Augusto Garbugio Silva ;
orientador, Robson Marcelo Di Piero, 2018.
102 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e
Biociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

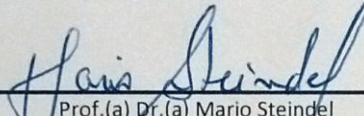
1. Biotecnologia e Biociências. 2. O presente
estudo avaliou o potencial de leveduras para
controlar a Helmintosporiose na cultura de milho e
analisou os modos de ação dos agentes de
biocontrole.. I. Di Piero, Robson Marcelo. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. III.
Título.

"Leveduras para controle da Helmintosporiose em milho (*Zea mays*)"

Por

Paulo Augusto Garbugio da Silva

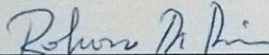
Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (005/2018/PPGBTC) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



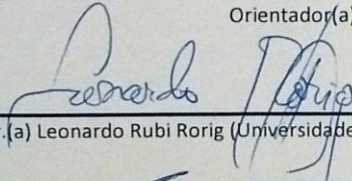
Prof.(a) Dr.(a) Mario Steindel

Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



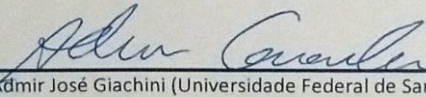
Dr.(a) Robson Marcelo Di Piero (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr.(a) Leonardo Rubi Rorig (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Marciel João Stadnik (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.(a) Admir José Giachini (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 29 de março de 2018.

Este trabalho é dedicado a Deus, a minha querida família, aos meus amigos de laboratório e ao meu orientador.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade e a CAPES pela bolsa de mestrado concedida;

Ao Professor Dr. Robson Marcelo Di Piero por todos os ensinamentos, pela paciência, dedicação e pela orientação ao longo do curso. Aos professores do programa, pelos ensinamentos e a dedicação. Ao Prof. Dr. Marcio José Rossi e o Doutorando Willian Alexandre Suguino, pelas linhagens de leveduras. Aos doutores Leonardo Rörig, Admir José Giachini e Marciel João Stadnik por aceitarem gentilmente participar da banca examinadora;

A todos os meus professores da Escola Estadual José Garbugio, do Colégio Estadual Romário Martins e da Universidade Estadual de Ponta Grossa, que abriram as portas do mundo da ciência em minha vida;

Aos colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia: Ludiana, Paula F., Eduardo, Denise, Mateus, Ariana, Camile, Argus, Luciana, Charles, Felipe, Débora, Aline, Marlon, Zamira, Tarsis, Juliana, Juliane, Carolina e Caroline, por todo cafezinho, por toda dedicação, carinho, ensinamentos e ajuda nesses dois anos;

Em especial às minhas amigas Bruna, Lida, Paula A. e ao Charles Coelho, por todo o carinho e ajuda nos momentos de maior dificuldade;

Ao meu irmão e aos meus pais por toda a dedicação e amor;
E a Deus pelo dom da vida.

"Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, sou como o bronze que soa, ou como o címbalo que retine. Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se não tiver amor, não sou nada. Ainda que distribuísse todos os meus bens em sustento dos pobres, e ainda que entregasse o meu corpo para ser queimado, se não tiver amor, de nada valeria! O amor é paciente, o amor é bondoso. Não tem inveja. O amor não é orgulhoso. Não é arrogante. Nem escandaloso. Não busca os seus próprios interesses, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se rejubila com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acabará. As profecias desaparecerão, o dom das línguas cessará, o dom da ciência findará. A nossa ciência é parcial, a nossa profecia é imperfeita. Quando chegar o que é perfeito, o imperfeito desaparecerá. Quando eu era criança, falava como criança, pensava como criança, raciocinava como criança. Desde que me tornei homem, eliminei as coisas de criança. Hoje vemos como por um espelho, confusamente; mas então veremos face a face. Hoje conheço em parte, mas então conhecerei totalmente, como eu sou conhecido. Por ora subsistem a fé, a esperança e o amor - as três. Porém, o maior deles é o amor."

(São Paulo Apostolo, I Coríntios, 13)

RESUMO

A Helmintosporiose causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs é uma doença recorrente na cultura do milho. O patógeno provoca manchas foliares que resultam em perdas significativas na produção em muitos países. O uso de agroquímicos é a principal medida para o manejo desta doença. Entretanto, pesquisas recentes apontam que o uso de leveduras como agentes de biocontrole poderiam reduzir a severidade da doença em distintos patossistemas. Apesar de existir uma grande diversidade de leveduras, os principais estudos descrevem o efeito antagonista e elicitor da *Saccharomyces cerevisiae* como principal agente de biocontrole. O presente estudo tem por objetivo avaliar o potencial de diferentes leveduras para o controle da Helmintosporiose na cultura de milho. Foram testadas 19 leveduras de diversas fontes de isolamento e verificado o efeito destas sobre a severidade da doença. Avaliou-se o efeito das leveduras no diâmetro do micélio do fungo *in vitro*, na germinação de conídios e formação de apressórios *in vivo*, assim como foram avaliados mecanismos de defesa das plantas de milho tratados com a suspensão de células de levedura. Entre os isolados selecionados, as leveduras 181 e i6 se destacaram, reduzindo a severidade da doença em média de 70 e 58,5%, respectivamente, quando aplicadas 3 dias antes da inoculação das plantas. As leveduras diminuíram o tamanho médio da colônia do fitopatógeno *in vitro*, mas não produziram compostos voláteis com efeito antimicrobiano. A redução na germinação de conídios foi significativa apenas para a levedura 181. Por outro lado, ambas as leveduras 181 e i6 diminuíram drasticamente a formação de apressórios

simples e duplos nos conídios germinados de *E. turcicum* sobre as folhas de milho. Quanto a alterações metabólicas, a levedura 181 provocou aumento no teor de proteínas totais e na atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas. Dessa maneira, conclui-se que as leveduras 181 e i6 possuem potencial como agentes de biocontrole da Helmintosporiose, atuando como antagonistas e possivelmente como indutoras de mecanismos de resistência em plantas de milho.

Palavras-chave: Helmintosporiose. Controle Biológico. Leveduras. Antagonismo.

ABSTRACT

Northern Leaf Blight (NLB) is a recurrent disease in corn crop caused by the fungus *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. This fungus causes foliar lesions that result in significant losses in production in many countries. The use of agrochemicals is the main measure for the disease management. However, recent studies show that the use of yeast strains as biocontrol agents can promote a reduction in disease severity in several pathological systems. Although there is a great diversity of yeast strains, these studies describe the antagonistic and elicitor effect of *Saccharomyces cerevisiae* as a main bio control agent. This study aims to evaluate the potential of different yeast strains for the control of NLB in maize. A total of 19 strains isolated from different sources were tested for disease assessment. The effect of yeast strains over the diameter of fungal mycelium was evaluated *in vitro*, and conidia germination / appressorium formation was evaluated *in vivo*, and defense mechanisms induced in maize plants treated with yeast cells suspensions were also determined. Among the selected isolates, strain 181 and i6 reduced disease severity on average 70 and 58.5%, respectively, when applied 3 days before inoculation of the plants. These strains decreased significantly the mean size of the pathogen colony *in vitro*, but did not produce volatile compounds with antimicrobial effect. A reduction in the germination of conidia was observed by strain 181. On the other hand, both yeast 181 and 16 decreased drastically the formation of single and double appressoria of *E. turcicum* germinated conidia on corn leaves. As for metabolic alteration, strain 181 caused increase of total protein content and activity of phenylalanine ammonia-lyase in treated

plants. Thus, that strains 181 and i6 have potential as biocontrol agents of NLB, acting as antagonists and possibly as inducers of resistance mechanisms in corn plants.

Keywords: Northern Leaf Blight. Biological control. Yeasts. Antagonism.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Ranking dos principais estados produtores de milho no Brasil, safra 2016/2017..... 33
- Figura 2 - Folha de milho utilizada para isolar o fitopatógeno. 48
- Figura 3 - Grãos de sorgo colonizados por *Exserohilum turcicum*, dispostos sobre folhas de papel toalha umedecidas, no interior de caixas plásticas..... 53
- Figura 4 –Escala diagramática para avaliação da porcentagem de área foliar lesionada por *Exserohilum turcicum*. 57
- Figura 5 - Método utilizado para o experimento de antagonismo. Modelo da placa de Petri contendo a levedura confrontada com *Exserohilum turcicum*. 59
- Figura 6 - Amostragem para analisar mecanismos bioquímicos de defesa das plantas tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, com o momento do tratamento (◊), inoculação (■) e os tempos de coleta representados por ●..... 62
- Figura 7 – Lesão e colônia de *Exserohilum turcicum*. (A) lesão em folha de milho, sintoma típico de *E. turcicum*; (B e C) Colônia isolada de *E. turcicum*. 65
- Figura 8- Produção de conídios em folhas de milho: A – Grãos de sorgo inoculados com o fungo *Exserohilum turcicum*; B – Discos de micélio de *E. turcicum* crescidos em BDA; C – Suspensão de 10^4 conídios/mL de *E. turcicum*; D – Folhas com sintomas de Helmintosporiose; E – Folhas com sintomas de Helmintosporiose e inoculadas com 10^4 conídios/mL de *E. turcicum*; F – Folha com sintomas de Helmintosporiose sem desinfecção com álcool 70%. 67
- Figura 9 - Efeito da aplicação foliar de leveduras sobre a severidade da Helmintosporiose em milho, 3 dias antes da inoculação do patógeno, cultivar BM 207 Biomatrix®. Avaliação realizada aos 5 dias após a inoculação, (1º experimento). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. 69

Figura 10 - Efeito da aplicação foliar de leveduras sobre a severidade da Helminthosporiose em milho, 3 dias antes da inoculação do patógeno, cultivar BM 207 Biomatrix®. Avaliação realizada aos 5 dias após a inoculação, (2º experimento). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%..... 70

Figura 11 - Efeito da aplicação foliar de leveduras sobre a Helminthosporiose do milho, cultivar BM 207 Biomatrix®, em dois experimentos, aos 10 dias após a inoculação. (A e D) testemunha inoculada com *Exserohilum turcicum* à 10^4 conídios/mL; (B e E) plantas tratadas com leveduras e inoculadas com *E. turcicum* (10^4 conídios/mL); (C e F) testemunhas tratadas apenas com água destilada autoclavada. . 71

Figura 12 - Efeito do intervalo de tempo entre a aplicação foliar das leveduras e a inoculação com *Exserohilum turcicum* sobre a severidade da Helminthosporiose em milho, cultivar P 1636H Pioneer®. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. 72

Figura 13 - Diâmetro médio das colônias de *Exserohilum turcicum* confrontado com as leveduras 181, 155, SC, i5 e i6. Avaliação realizada 7 dias após a incubação. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%..... 73

Figura 14 - Efeito de compostos voláteis das leveduras 181, 155, SC, i5 e i6 sobre o diâmetro médio das colônias de *Exserohilum turcicum*. Avaliação realizada 7 dias após a incubação. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. 74

Figura 15 - Conídios de *Exserohilum turcicum* germinados sobre folhas de milho apresentando apressório eminente, 24 h após a inoculação das plantas. (A) Conídio com um apressório 50 µm (Aumento 60 X). (B) Conídio com formação de duplo apressório 100 µm (Aumento 40 X). Setas indicam o apressório. 76

Figura 16 - Conteúdo de flavonoides em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Resultados expressos em µg de equivalente de quercetina (E.Q.) por g de massa foliar fresca (M.F.F.) Plantas inoculadas aos 3 DAT. 77

Figura 17 - Concentração de proteína total (ug/mL) em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em um mesmo tempo amostral, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% Plantas inoculadas aos 3 DAT..... 78

Figura 18 - Atividade de guaiacol peroxidases em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Letras minúsculas iguais, em um mesmo tempo amostral, indicam não haver diferenças entre tratamentos; letras maiúsculas iguais indicam não haver diferenças entre plantas inoculadas ou não (dentro do mesmo tratamento), pelo teste de Tukey a 5%. Plantas inoculadas aos 3 DAT..... 79

Figura 19 - Atividade de fenilalanina amônia-liase, em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Letras minúsculas iguais, em um mesmo tempo amostral, indicam não haver diferenças entre tratamentos; letras maiúsculas iguais indicam não haver diferenças entre plantas inoculadas ou não (dentro do mesmo tratamento), pelo teste de Tukey a 5%. Plantas inoculadas aos 3 DAT..... 80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas no estudo. 55

Tabela 2 - Severidade da Helminthosporiose, porcentagem de germinação de conídios e da formação de apressório simples e duplos em conídios germinados do fungo *E. turcicum* sobre a folhas de milho cultivar P 1636H Pioneer®, em plantas previamente tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada. Avaliação microscópica e da severidade da doença realizadas 24 h e 120 h após a inoculação, respectivamente. ... 75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BDA – Ágar Batata Dextrose

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

EDTA - Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético

HCl - Ácido Clorídrico

IR - Indução de Resistência

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	25
1.1 OBJETIVOS	29
1.1.1 Objetivo Geral.....	29
1.1.2 Objetivo Específico	29
1.2 HIPÓTESE	30
2. HELMINTOSPORIOSE DO MILHO E O SEU CONTROLE POR LEVEDURAS	31
2.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA	31
2.2 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E NUTRICIONAL DO MILHO	34
2.3 HELMINTOSPORIOSE NO MILHO	36
2.4 CONTROLE BIOLÓGICO	39
2.4.1 Controle biológico de doenças	39
2.4.2 O uso de leveduras no controle biológico	41
2.5 MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFESA	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	47
3.2 PATÓGENO	47
3.2.1 Cultura monospórica	49
3.2.2 Identificação do isolado	49
3.3 PRODUÇÃO DE CONÍDIOS	50
3.3.1 Preparo do inoculo de <i>E. turcicum</i>.....	53
3.4 LEVEDURAS	54
3.5 EFEITO DAS LEVEDURAS SOBRE A SEVERIDADE DA DOENÇA.....	55

3.6 EFEITO DO INTERVALO DE APLICAÇÃO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DAS PLANTAS	58
3.7 EFEITO ANTAGONISTA.....	58
3.8 ANÁLISE DO PROCESSO INFECCIOSO	59
3.9 AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA EM PLANTAS DE MILHO	61
3.9.1 Tratamento e coleta de amostras	61
3.9.2 Determinação do conteúdo de flavonoides	62
3.9.3 Determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade de enzimas	63
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
4. RESULTADOS.....	65
4.1 PATÓGENO	65
4.2 LEVEDURAS	68
4.3 EFEITO DAS LEVEDURAS SOBRE A SEVERIDADE DA DOENÇA	68
4.4 EFEITO DO INTERVALO DE APLICAÇÃO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DAS PLANTAS	72
4.5 EFEITO ANTAGONISTA.....	73
4.6 ANÁLISE DO PROCESSO INFECCIOSO	74
4.7 ENSAIOS BIOQUÍMICOS REALIZADOS EM PLANTAS DE MILHO.....	77
4.7.1 Flavonoides	77
4.7.2 Proteínas totais	78
4.7.3 Guaiacol Peroxidase	79
4.7.4 Fenilalanina amônia-liase - FAL.....	80
5. DISCUSSÃO.....	81

6. CONCLUSÃO	90
REFERÊNCIAS.....	91
ANEXO	101

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentre as principais matrizes alimentares produzidas no mundo, destaca-se o milho (*Zea mays.*), devido à crescente demanda no mercado global, impulsionada pelo crescimento econômico dos países asiáticos, pela produção de etanol à base do cereal nos Estados Unidos, além da ampla utilização na produção de alimentos para consumo humano, animal e produção de derivados. Nos últimos anos, o Brasil tornou-se o terceiro maior produtor de milho no mundo, e o aumento na demanda fez com que o preço desse produto alcançasse na safra 2015/2016, o maior valor já cotado na história (PAVÃO; FILHO, 2011; BIOMERCADO, 2016; CONAB, 2018).

Entre os principais problemas para a produção de milho, podemos destacar as manchas foliares (LENNÉ, 1994), como a Helminthosporiose, uma doença recorrente em escala mundial. O agente causal, *Exserohilum turcicum* infecta, inicialmente, as folhas inferiores, principalmente antes do estágio de floração e pode gerar perdas nas lavouras que compreendem 50% da produção (CARSON; VAN DYRE, 1994; FERNANDES; OLIVEIRA, 2000; REIS et al., 2004).

A maioria dos produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, aplicados ao manejo dessas manchas foliares, pertence aos grupos químicos dos triazóis e das estrobilurinas. O uso contínuo desses fungicidas na agricultura resulta na seleção de fungos fitopatogênicos resistentes aos agrotóxicos utilizados. Tal problema pode gerar graves consequências, como o aumento de custos da produção de alimentos, comprometer a produtividade, aumentar os resíduos de agrotóxicos nos alimentos e

contaminar ambientes naturais. Os diversos segmentos da sociedade envolvidos no controle químico de doenças em plantas devem estar conscientes do problema da resistência, suas causas e soluções (MICHEREFF; BARROS, 2001; SANTOS et al., 2006).

No cenário nacional, não existe muita perspectiva do registro de novas moléculas para o manejo dessas doenças nos próximos anos, mas o avanço dos estudos sobre microrganismos fitopatogênicos, de suas interações, e a descoberta de culturas suscetíveis e resistentes a certos tipos de agentes causais, associado à adoção de métodos alternativos para o controle de doenças em plantas, constitui importante ferramenta para a amenização desses problemas, sendo fundamental para se alcançar a sustentabilidade na agricultura (PEREIRA, 2008).

O bom desempenho de leveduras como agentes de biocontrole faz com que esses microrganismos ganhem espaço como uma ferramenta alternativa no manejo de doenças foliares nas lavouras. Tais microrganismos possuem diversos modos de ação contra os fitopatógenos. Dentre eles podemos destacar a competição com os fitopatógenos por espaço e nutrientes, micoparasitismo, antibiose, indução de resistência em plantas por meio de elicitores presentes em sua estrutura e por meio da produção de toxinas antimicrobianas e álcool (STANGARKIN et al., 1994; RIMA; STEVE; ISMAIL, 2012; MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

Na literatura é possível encontrar trabalhos que descrevem o uso de leveduras no controle de fungos que causam doenças em pós-colheita, e até mesmo no controle de patógenos veiculados pelo solo. El-Tarabily (2004) comprovou a redução na severidade da podridão de raízes e na incidência de tombamento por *Rhizoctonia solani* em

plântulas de beterraba tratadas com as leveduras *Candida valida*, *Trichosporo nasahii* e *Rhodotorula glutinis*.

Já em estudos conduzidos por Ponsone et al. (2011), foi comprovada a eficiência de duas cepas das leveduras *Kluyveromyces thermotolerans* na inibição do crescimento de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus nigri* e ainda na redução da produção da toxina ocratoxina A em uvas. Os autores ressaltam que esses resultados permitiram a criação de um biopesticida à base dessas leveduras.

Entretanto, o uso de leveduras para o controle de fitopatógenos que causam manchas foliares ainda é muito restrito. Apesar de existir uma grande diversidade de leveduras, as principais publicações descrevem o efeito elicitor e antagonista da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Isso se deve à facilidade de cultivo desta levedura em laboratório ou da aquisição de linhagens no mercado. Da Silva (1992) mostraram que suspensões de células de *S. cerevisiae* e o filtrado de cultivo da levedura inibiram a germinação de esporos e a formação de apressórios de *Colletotrichum graminicola*, protegendo plantas de milho contra o patógeno. Em experimento de campo, Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005) concluíram que o tratamento à base de suspensão de células de *S. cerevisiae* em sorgo reduziu de maneira significativa a antracnose a partir de uma única aplicação da levedura, sem comprometer a produtividade da cultura em campo.

Bonaldo (2005) utilizou células da levedura *S. cerevisiae* autoclavadas por 4 horas em sequência, e concluiu que elicitores termoestáveis presentes na parede da levedura induziram a síntese de fitoalexinas em folhas e mesocótilos de sorgo, conferindo proteção dessa cultura contra *C. sublineolum*. Esses elicitores também reduziram

a área foliar lesionada em plântulas de pepino inoculadas com *Colletotrichum lagenarium* (LABANCA 2002).

Assim, o presente estudo objetiva avaliar o potencial de leveduras para controlar a Helmintosporiose causada pelo fungo *E. turcicum* na cultura de milho e analisar os modos de ação dos agentes de biocontrole.

1.1 OBJETIVO

1.1.1. Objetivo Geral

Determinar o potencial de diferentes leveduras para o controle da Helmintosporiose na cultura de milho.

1.1.2. Objetivos Específicos

- Selecionar leveduras com potencial de biocontrole da Helmintosporiose em Milho;
- Determinar o intervalo de tempo ideal entre a aplicação da levedura e a inoculação do patógeno visando reduzir a severidade da Helmintosporiose;
- Verificar o potencial antifúngico de diferentes leveduras sobre *Exserohilum turcicum* *in vitro* e *in vivo*;
- Analisar mecanismos bioquímicos de defesa vegetal que podem ser ativados e/ou sintetizados por meio do tratamento do milho com as leveduras selecionadas.

1.2. HIPÓTESE

A aplicação de leveduras em plantas de milho diminui a severidade da Helmintosporiose e aumenta o teor de compostos de defesa nas folhas.

2. HELMINTOSPORIOSE DO MILHO E O SEU CONTROLE POR LEVEDURAS

2.1. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

O milho é o terceiro cereal mais cultivado no mundo, ficando atrás apenas do arroz e do trigo. O milho tem sua origem na América Central, mais especificamente na região do México onde foi domesticado pelos astecas, por volta de 3500 A. C. Inicialmente, os grãos foram cultivados por toda a América, e com a colonização europeia, o cereal foi levado para diversas regiões do mundo (GARCIA et al., 2006).

O milho está entre as culturas de maior interesse econômico mundial. Isso se dá pela ampla utilização do seu grão, pois é uma das plantas mais eficientes no armazenamento de energia, sendo utilizada em diferentes segmentos da economia. De acordo com Paes (2006), aproximadamente 70% da produção total da cultura é direcionada para o agronegócio, especificamente, na alimentação animal. De acordo com o mesmo autor, esses valores podem ser maiores em países desenvolvidos, chegando a 85%, em contrapartida aos 15% que são destinados ao consumo humano.

O USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos) prevê para a safra 2017/2018 uma produção global de 1,042 bilhões de toneladas de milho, uma redução em torno de 3,2% em relação à safra recorde 2016/2017, ocasionada por condições climáticas adversas. O Brasil é o terceiro país que mais produz milho no mundo, ficando atrás apenas da China e dos Estados Unidos. Na safra 2017/2018, o Brasil

produziu 95 milhões de toneladas em aproximadamente 3,6 milhões de propriedades rurais, totalizando uma área cultivada de 17,592 milhões de hectares, e alcançou uma produtividade média de 5.100 kg/ha (MAPA, 2017; CONAB, 2017; CONAB, 2018; USDA, 2018).

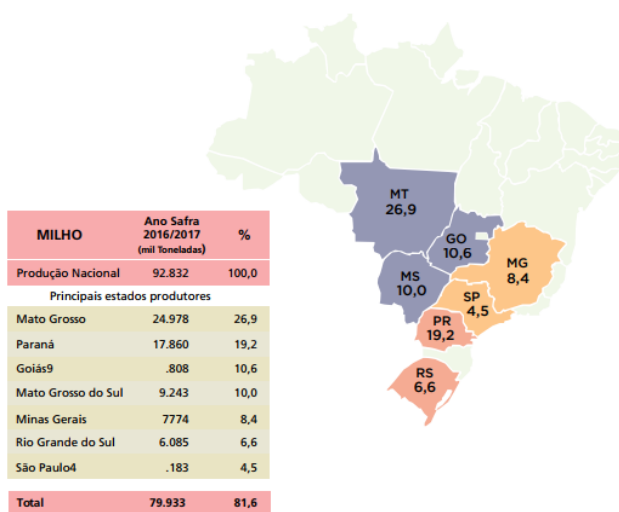
A planta é cultivada em grande parte do país, e tem como seus maiores produtores os estados do Mato Grosso (26,9%), Paraná (19,2%), Goiás (10,6%), Mato Grosso do Sul (10,0%) Minas Gerais (8,4%), Rio Grande do Sul (6,6%) e São Paulo (4,5%). Juntos, esses estados são responsáveis por 81,6% da produção brasileira, o que equivale a aproximadamente 80,0 milhões de toneladas (Figura 1). Mesmo com a grande quantidade de produção do grão, a safra 2016/2017 registrou uma queda de 3,6% em relação à safra anterior, redução menor que a média mundial (CONAB 2017; CONAB 2018; MAPA, 2017).

Santa Catarina é o 8º maior produtor de milho do Brasil, com uma produção de 3,1 milhões de toneladas na safra 2016/2017. Mesmo assim, o estado é considerado deficitário no balanço entre oferta e demanda de milho, pois é um dos maiores consumidores do grão no país. Somente no ano de 2016, o consumo de milho em Santa Catarina atingiu 6,6 milhões de toneladas, onde 95,9% da produção foi destinada para alimentação animal, sendo 42,9% para produção de frango de corte e 42,5% para suinocultura, setores que exigem uma demanda constante do grão (CONAB 2017; MAPA, 2017).

Grande parte da produção de milho no estado de Santa Catarina provém da agricultura familiar. O censo agropecuário de 2006 realizado pelo IBGE divulgou que a agricultura familiar no estado é responsável por 44% das áreas cultivadas, e gera 67% do valor total da

produção agrícola do estado. A agricultura familiar também é responsável pela produção de 76,5% do milho, sendo de grande importância para a cadeia produtiva de proteína animal. .

Figura 1- Ranking dos principais estados produtores de milho no Brasil, safra 2016/2017.



Fonte: Conab, 2017.

De acordo com dados divulgados pelo governo brasileiro por meio da Companhia Nacional de Abastecimento – Conab (2017), o mercado exportador de milho em 2018 será mais competitivo que nas safras anteriores, pois o estoque de milho no mundo está alto, mesmo com a queda na produtividade do cereal ocorrida nos principais produtores do mundo na safra 2016/2017. Os Estados Unidos continuam sendo o maior produtor e exportador do milho do mundo, mas tendem a perder espaço devido ao aumento no cultivo do grão em países da América do Sul, como Brasil e Argentina. A Argentina possui uma

vantagem sobre o Brasil, devido à retirada de impostos sobre as exportações, o que promove um aumento na exportação do grão no país, previsto em aproximadamente 28,5 milhões de toneladas.

2.2. CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA E NUTRICIONAL DO MILHO

O milho é uma monocotiledônea e pertence à família Poaceae (Gramíneas), podendo ser cultivado desde o nível do mar até 3600 m de altitude. O cereal necessita de aproximadamente 600 mm de água durante o seu ciclo, mas esse volume varia de acordo com a cultivar e a sazonalidade, de forma que o seu cultivo pode ser feito em regiões onde a precipitação média varia entre 300 a 5.000 mm anuais. A raiz da planta é classificada como fasciculada, podendo atingir até 30 cm de comprimento. Porém, fatores como pH, disponibilidade de água, nutrientes e compactação do solo podem influenciar esse tamanho. O ciclo das principais cultivares de milho é em média de 90 dias, podendo atingir duas safras no ano. No Brasil, a primeira safra é plantada nos meses de agosto/dezembro com período de colheita entre novembro/março. A segunda safra, ou também popularmente chamado de milho safrinha é cultivada logo após a colheita da soja, sendo plantado nos meses de janeiro/março com previsão de colheita para abril/junho (MAGALHÃES; DURÃES; PAIVA, 1995; MAGALHÃES; DURÃES, 2006; MICHELOTTO et al., 2017)

A planta de milho apresenta um colmo ereto, dividido em nó, podendo atingir até 2 m de altura. Entretanto, o seu tamanho pode variar conforme a variedade do híbrido, e as condições nas quais a planta está

inserida (disponibilidade de água, nutrientes, compactação do solo, entre outros). As folhas são dispostas, alternadamente, tendo o comprimento maior que sua largura, apresentando limbo, bainha e pecíolo. Sua coloração vai de verde escuro a verde claro, chegando a um tom de amarelo queimado no final do seu ciclo (BARROS; CALADO, 2014; MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

A planta apresenta um único pedúnculo, alto e com folhas múltiplas, produzindo flores masculinas e femininas na mesma planta, em posições diferentes, sendo considerada uma planta monóica. O pendão é a parte masculina que produz o pólen, a espiga é a parte feminina, produz os óvulos, que após cruzados se transformam em grãos (MAGALHÃES; DURÃES; PAIVA, 1995; NETO et al., 2003).

Na cultura do milho podemos observar duas fases de desenvolvimento: vegetativo e reprodutivo. O vegetativo é caracterizado pelo desenvolvimento da planta, onde cada estágio é definido de acordo com a formação visível do colar na inserção da bainha da folha com o colmo. Assim, essa fase inicia-se com o estágio VE - Estádio de Emergência, passando para V1, V2, V3, chegando até o V18. A fase vegetativa finaliza no estágio Vt, caracterizado pelo pendoamento da planta. A fase reprodutiva é caracterizada pelo surgimento e enchimento de grãos na espiga de milho, onde os estádios de desenvolvimento são subdivididos em R1 até o R6, onde a planta atinge o ponto de maturação comercial e senescência da planta (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

O milho é rico em carboidratos e lipídios. O óleo do milho é utilizado na prevenção de doenças e combate ao colesterol, sendo um alimento de extrema importância para a alimentação humana. O milho também apresenta vitamina E, carotenos do tipo alfa e beta, que são uma

substância provitamina A. Já o grão de milho verde apresenta altos teores de fibras, que o faz ser utilizado em centenas de alimentos (PAES, 2006).

2.3. HELMINTOSPORIOSE NO MILHO

Para se manter uma alta produtividade na cultura do milho, é necessário o investimento em pesquisas, com foco na criação de novos pacotes tecnológicos e novas variedades adaptadas às necessidades do ambiente. Assim, o atual desafio da agricultura moderna é conciliar o desenvolvimento de novas tecnologias com o aprimoramento de técnicas de manejo, visando aumentar a produtividade, a fim de suprir a demanda de milho no mercado mundial (ALVES, 2014).

No sistema moderno de produção de milho em larga escala, são comuns as epidemias ocasionadas por fungos. Merecem destaque na cultura as manchas foliares. Diversos fatores contribuem para o aparecimento de patógenos na lavoura a campo, tais como: manejo inadequado em sistema de plantio direto na palha, baixa ou ausência de rotação de cultura na lavoura, utilização de diferentes sistemas inadequados de irrigação, produção em larga escala e a monocultura (PINTO, 2004; MANFROI et al., 2016).

A Helmintosporiose do milho causada pelo fungo *Exserohilum turcicum* é uma doença que ocorre em quase todas as regiões do Brasil, principalmente na região Sul e Centro-Oeste, onde epidemias aparecem com mais frequências. O pico da doença ocorre nos meses de outubro a dezembro, ocasionando grandes prejuízos quando a planta é infectada na

época da floração. O patógeno possui a capacidade de sobreviver como saprófito em restos culturais por longos períodos ou até formar estruturas de resistências, denominadas clamidósporos. Em épocas mais quentes ocorre a liberação de conídios pelos ventos e principalmente pela chuva em períodos de alta umidade relativa, onde os conídios atingem as folhas de milho. A infecção primária acontece por meio da germinação de conídios que permanecem em contato sobre a folha do milho por mais de 6 horas, ocorrendo a formação de um ou dois apressórios e a penetração da hifa no hospedeiro. A incidência da Helmintosporiose se agrava nas folhas mais velhas em linhagens de milho susceptíveis e em temperaturas entre 18° C a 30 °C, comunidade relativa do ar alta, geralmente entre 80% a 100% (LEVY, 1991; CARSON; VAN DYRE, 1994; FERNANDES; OLIVEIRA, 2000; CASELA et al., 2006; GUIOMAR, 2011; COTA; SILVA; COSTA, 2013; ROSSI; REIS; BRUSTOLIN, 2015; SARTORI et al., 2015).

Um estudo realizado por Levy (1991), comparando isolados de *E. turcicum* provenientes de diferentes lavouras em Israel, demonstra diferenças entre populações de *E. turcicum* de diferentes regiões, quanto à área foliar lesionada pelo fungo e à esporulação. Contudo, os isolados não diferiram quanto à porcentagem de germinação de conídios, formação de apressórios e capacidade de penetração. O autor ressalta que essas diferenças são menores entre a população na mesma lavoura. Já no Brasil, as populações de *E. turcicum* também apresentam alta variabilidade, devido à capacidade de adaptação e esporulação e pela alta adaptabilidade da espécie ao ambiente. Isso faz com que o patógeno se adapte aos híbridos comerciais resistentes ao longo das gerações (COTA; SILVA; COSTA 2013).

A infecção de *E. turcicum* resulta em manchas foliares no milho, com a coloração marrom acinzentada, medindo entre 2,5 a 15 cm de comprimento. Os conídios podem ser formados individualmente ou em grupos de 2-5 indivíduos e possuem em média 5 a 9 septos, coloração castanha clara a hialina, tem formato cilíndrico, podendo ser retos ou flexíveis. Geralmente, os sintomas da doença aparecem primeiro nas folhas inferiores da planta, e acabam alcançando as folhas da parte superior. Entretanto, em lavouras com elevados índices pluviométricos, o aparecimento da doença pode iniciar-se a partir da parte superior da planta, o que pode gerar maiores danos à lavoura, devido ao fato de que as folhas acima da espiga são responsáveis por acumular entre 50 a 80% da matéria seca nos grãos (MAGALHÃES; DURÃES; PAIVA, 1995; CASELA et al., 2006; GUIOMAR, 2011; ZANATTA 2013; HIRAN et al., 2015).

Nesse sentido é fundamental a tomada de decisão para o controle de doenças na lavoura, que podem comprometer até 100% da sua produtividade. Medidas preventivas devem ser tomadas para evitar o desenvolvimento da Helmintosporiose na cultura, como por exemplo, o uso de variedades resistentes ao ataque desses organismos, rotação de cultura, formulações de adubações corretas, manejo integrado de pragas (MIP), e o uso de agrotóxicos (FIGUEREDO *et al.*, 2010).

O controle da Helmintosporiose pode ser realizado por meio da aplicação de fungicidas, desde que a doença seja detectada no campo, na fase inicial. No Brasil, os fungicidas mais utilizados no controle possuem ação sistêmica, pertencentes ao grupo químico dos tebuconazóis, estrobilurinas e dos triazóis, registrados pelo Ministério da Agricultura. Entretanto, uma mistura composta por azoxistrobina

com ciproconazol, tem apresentado melhor resultado no combate à doença (FERNANDES E OLIVEIRA, 2000; GUIOMAR, 2011). Porém, existem diversos debates sobre os impactos que esses produtos podem gerar ao meio ambiente e para a saúde pública. O Brasil, desde 2008, lidera o ranking sendo o maior consumidor de agrotóxico no mundo. Entretanto, pesquisadores vêm desenvolvendo diferentes estudos para o controle de doenças na cultura do milho a campo, com objetivo de reduzir o uso de agrotóxicos nas lavouras (MENTEN, 2016; SILVA, 2016).

Como ferramenta alternativa e eficaz da substituição dos agrotóxicos, o uso de cultivares resistentes a doenças é a ação mais eficiente no controle da Helmintosporiose, além de ser a alternativa economicamente mais viável. Entretanto, existem outros meios de controle alternativo, que estão divididos em controle biológico e indução de resistência (FERNANDES E OLIVEIRA, 2000; GUIOMAR, 2011).

2.4. CONTROLE BIOLÓGICO

2.4.1. Controle Biológico de doenças

Para Cook e Baker (1983), a definição do controle biológico em plantas envolve a redução na concentração do inóculo e na infecção da doença, graças à ação de um ou mais organismos vivos, não sendo de ação humana.

O controle biológico tem como finalidade o controle de pragas agrícolas e insetos transmissores de doenças, por meio dos seus inimigos naturais. Nos últimos anos, pesquisadores estão direcionando energias a fim de encontrar soluções para combater fitopatógenos por meio do uso dessa ferramenta. As estratégias para se isolar agentes de biocontrole eficazes contra fitopatógenos vêm se intensificando. Diversos estudos vêm sendo publicados e demonstraram a eficácia de agentes de biocontrole contra patossistemas específicos, ou até mesmo contra diversos patógenos na mesma ou em diferentes culturas. Na maioria desses estudos, os principais agentes de biocontrole usados para combater fitopatógenos são bactérias. Entretanto alguns autores exploraram o uso de leveduras para este fim, que exercem função muito semelhante à das bactérias (ANDREWS; HARRIS, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003; RIMA; STEVE; ISMAIL, 2012; TSUDA et al., 2016; PEREZ et al., 2017). Embora existam vários estudos realizados na área de controle biológico contra fitopatógenos, existem poucos exemplos de produtos comerciais disponíveis no mercado (HARMAN, 2000).

No Brasil o controle biológico vem crescendo ao longo dos anos, mas um crescimento restrito, quando comparado ao potencial biológico que a biodiversidade brasileira possui. A baixa disponibilidade de produtos biológicos para controle de fitopatógenos no Brasil, também é associada ao perfil mais conservador do agricultor brasileiro. E as vantagens que a proteção de plantas através do uso de agrotóxicos apresentam são mais atraentes para os agricultores, pois são métodos simples, previsíveis e de fácil aplicação, ao contrário de produtos biológicos, que requerem um maior entendimento dos processos básicos

do agroecossistema, para garantir uma melhor eficácia do método empregado (MORANDI; et al., 2009).

2.4.2. O Uso das Leveduras no Controle Biológico

As leveduras são organismos unicelulares procariontes, pertencem ao reino Fungi, com parede celular rígida e muito complexa quimicamente, composta de diversas proteínas e carboidratos como quitina, mananas entre outras. As leveduras são organismos heterótrofos, considerados organismos cosmopolitas pois colonizam locais com presença de matéria orgânica ou parasitam outros seres vivos, sendo muito comuns em órgãos vegetais, principalmente as folhas e frutos, no solo, na água, no sistema digestivo de alguns animais entre outros (LACAZ; MINAMI; PURCHIO, 1970; PELCZAR; REID; CHAN, 1980; BOID 1992).

O bom desempenho das leveduras como agentes de biocontrole se deve a diversos modos de ação desses microrganismos contra os fitopatógenos. Dentre esses podemos destacar a competição com os fitopatógenos por espaço e nutrientes, micoparasitismo, antibiose, indução de resistência em plantas e a produção de toxinas antimicrobianas e de álcool pelas leveduras. O entendimento desses mecanismos de biocontrole é fundamental para se aprimorar a ação desses microrganismos no combate de doenças em plantas (RIMA; STEVE; ISMAIL, 2012; MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

A maioria dos trabalhos sobre controle biológico utilizando leveduras são para controle de patógenos de pós-colheita. Alguns

trabalhos indicam os principais mecanismos de ação dessas leveduras. A levedura *Candida oleophila*, por exemplo, componente do produto comercial Aspire®, recomendado para o controle de doenças em pós-colheita de frutas cítricas e maçãs, age por antagonismo e por competição por espaço e nutrientes (Bar-shimon et al., 2004). Em adição, os autores constataram que a levedura foi capaz de sintetizar, em meio de cultura contendo fragmentos de parede celular de *Penicillium digitatum*, várias enzimas envolvidas na degradação de parede celular desse fungo, como a exo- β -1,3-glucanase e quitinase, presentes logo no estágio inicial de crescimento, assim como a produção de proteases foi aumentada entre 6-8 dias. Evidenciaram, ainda, que essa levedura foi capaz de secretar exo- β -1,3-glucanase sobre a superfície de frutos de toranja (grapefruit), onde apresentaram efeitos na inibição da germinação de esporos e no alongamento do tubo germinativo de *P. digitatum*.

Poucos estudos descrevem o uso de leveduras no controle biológico de manchas foliares. Stangarlin & Pascholati (1994) verificaram que *S. cerevisiae* conferiu proteção contra *E turcicum* em plantas de milho, envolvendo redução no tamanho e no número de lesões por planta, na esporulação do fungo sobre as folhas do milho sendo também constatada a inibição da germinação e da penetração dos conídios. Os autores evidenciaram que ocorria antibiose e indução de resistência apresentando diferentes respostas em função do intervalo de tempo entre a aplicação da levedura e a inoculação das plantas. Já Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005) concluíram que o tratamento semanal à base de suspensão de *S. cerevisiae* em folhas de sorgo reduziu a antracnose causada por *C sublineolum* e melhorou a

produtividade da cultura. Já ao se aplicar suspensões de células de *S. cerevisiae* em plantas de milho, esses autores observaram que ocorreu redução na área foliar lesionada por *E. turcicum* em plantas tratadas semanalmente e até em plantas tratadas uma única vez com a suspensão de células de *S. cerevisiae*.

2.5. MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE DEFESA

A indução de resistência é um método alternativo aos fungicidas, sendo utilizada no controle de doenças de plantas por ser efetiva contra um amplo espectro de patógenos (PASCHOLATI, 1995; CARVALHO, 2012). A resistência induzida consiste no aumento da resistência por meio do uso de agentes abióticos ou bióticos, que ao entrar em contato com a planta, tem seus elicitores (moléculas de natureza variável como carboidratos, glicoproteínas, proteínas e lipídios) reconhecidos por receptores na membrana do vegetal. Isso desencadeia a ativação de mecanismos de defesa já existentes na própria planta, gerando alterações metabólicas de algumas enzimas chave envolvidas nas vias de sínteses do metabolismo primário e secundário dos vegetais. Essas mudanças podem atuar no processo de lignificação, suberização e metabolismo de parede celular, além desses elicitores serem sinalizadores para a síntese de uma gama de substâncias que mostram-se tóxicas aos fitopatógenos no interior da célula, como alguns compostos fenólicos, flavonóides, peroxidases, terpenos, glucanases, quitinases, fitoalexinas, entre outros que irão produzir uma série de respostas a fim de impedir a infecção (PASCHOLATI, 1995; TAIZ; ZIEGER, 2004; CHITARRA;

CHITARRA, 2005; FILIPPI, SILVA; PRABHU, 2007; SHETTY et al., 2008; CARVALHO, 2012).

Elicitores derivados da parede celular e metabólitos de fungos vêm sendo estudados, a fim de caracterizar seu potencial para uso como indutores de resistência aplicados no combate a doenças de plantas. Diversos trabalhos mostram o efeito de elicitores da levedura *S. cerevisiae* no controle de várias doenças de plantas. Isso se dá pelo fato de que a *S. cerevisiae* possui compostos como quitina, β -glucanas, oligômeros de N-acetil glucosamina, e ergosterol que podem ser reconhecidos como elicitores de respostas de defesa em células vegetais sem apresentar patogenicidade (BOLLER, 1995; PASCHOLATI, 1995; LABANCA, 2002).

Um estudo realizado por Zanardo, Pascholati e Fialho (2009) mostra o efeito de indução de resistência em plântulas de pepino contra *C. lagenarium*, por meio do tratamento das plantas com elicitores presentes em frações de extrato da levedura *S. cerevisiae*. As plantas de pepino tratadas apresentaram uma redução na severidade da doença entre 72 a 98%, dependendo do tipo de fração e método de extração aplicado. Em um estudo semelhante, Bonaldo (2005) verificou que plantas de sorgo tratadas com células de leveduras autoclavadas induziram a síntese de fitoalexinas em folhas e mesocótilos, e conferiram proteção contra *C. sublineolum*.

Diversos trabalhos indicam mudanças no metabolismo de plantas tratadas com leveduras e ou seus metabólitos. Essas mudanças podem induzir a atividade de vários compostos de defesa vegetal, tais como peroxidase e fenilalanina amônia-liase, lipoxigenases, β -1,3-glucanases e as quitinases e conteúdo de compostos fenólicos, flavonoides e

fitoalexinas (PASSARDI et al., 2005; BOAVA et al., 2010; STANGARLIN et al., 2011).

As enzimas do grupo das peroxidases têm sua atividade aumentada em resposta ao processo infeccioso de um patógeno, e ao estresse oxidativo e ambiental. Assim, são utilizadas como indicadores de resposta de defesa das plantas. As peroxidases são responsáveis pela catálise da redução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em oxigênio e água. Também fazem parte de vias metabólicas envolvidas na oxidação de compostos fenólicos, entre eles o fenilpropano, formando unidades de polímeros que são constituintes da lignina (PASSARDI et al., 2005; BOAVA et al., 2010; STANGARLIN et al., 2011; PASCHOLATI, 2011). Roncetto e Pascholati (1998) sugerem que suspensões de células, metabólitos e componentes da parede celular de *S. cerevisiae* promoveram modificações no metabolismo de milho e sorgo, o que foi evidenciado por meio da alteração na atividade da enzima peroxidase.

A fenilalanina amônia-liase é a primeira enzima que atua na síntese de compostos fenólicos, e sua atividade está diretamente envolvida na resposta à infecção por fitopatógenos. Faz parte da via metabólica de vários compostos de defesa das plantas, como a via metabólica do ácido salicílico. Também atua na catalise de L-fenilalanina em ácido trans-cinâmico, precursor de fitoalexinas e diversos compostos fenólicos presentes na formação de flavonoides.

O aumento em sua atividade está correlacionado com a concentração de fenilpropanóis, que participam da biossíntese de monômeros de lignina, uma das primeiras formas de defesa das plantas a infecção de fungos fitopatógenos. O tratamento de plantas a base de elicitores pode induzir a via dos fenilpropanóides, e consequentemente

pode elevar a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (DIXON; PAIVA, 1995; KOCH et al., 1998; GERASIMOVA; PRIDVOROVA; OZERETSKOVSKAYA, 2005; PASCHOLATI, 2011; ALMEIDA; BARBOSA; MARQUES, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

Os experimentos foram conduzidos na casa de vegetação do laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC entre 2016 e 2017. Foram utilizadas sementes de milho das cultivares BM 207 Biomatrix®, moderadamente suscetível a Helmintosporiose, e P1630H Pioneer®, suscetível a Helmintosporiose. O milho foi cultivado em vasos plásticos de 2 L, contendo aproximadamente 2 kg de solo comercial cada. Foram mantidas duas plantas por vaso e cada vaso foi considerado uma unidade experimental.

Foram registradas diariamente as temperaturas no interior da casa de vegetação, durante todo o período de condução dos experimentos, calculado a média entre as temperaturas máximas e mínimas dos dados coletados.

3.2. PATÓGENO

O fitopatógeno causador de Helmintosporiose, o fungo *E turcicum*, foi isolado de folha sintomática de milho em março de 2016, proveniente da Fazenda Experimental da Ressacada do Centro de Ciências Agrárias da UFSC Florianópolis - SC.

Fragmentos de 1 cm de comprimento da região de transição entre a lesão e a parte sadia da folha do milho foram retirados (Figura 2). Os fragmentos foram desinfetados em hipoclorito de sódio (0,5%) durante 1 minuto, posteriormente em solução de etanol (70%) por 30 segundos e em água destilada autoclavada. Depois, foram dispostos sobre placas de Petri com Batata Dextrose Ágar - BDA (Extrato de Batata – 200 g, dextrose 20 g, ágar 20 g em 1000 mL de água destilada e autoclavado a 121 °C por 20 minutos) e foram mantidos a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h luz e 12 h escuro por 4 dias.

Após o crescimento do fungo sobre os fragmentos da folha de milho, o mesmo foi repicado em uma placa de BDA e incubado no fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, a fim de obter uma cultura pura.

Figura 2 - Folha de milho utilizada para isolar o fitopatógeno.



Fonte: O autor (2016).

3.2.1. Cultura Monospórica

O fungo isolado foi crescido em BDA por 15 dias à 25 °C sob fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro. Posteriormente, adicionou-se água destilada e foi realizada uma raspagem superficial sobre o crescimento fúngico com uma alça de platina. A suspensão obtida foi filtrada com gaze autoclavada, a fim de separar os conídios das hifas do fungo. Este filtrado foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. O pellet contendo conídios foi ressuspenso em 5 mL de água destilada estéril, e foram depositadas gotas de 10 µL dessa suspensão sobre a superfície de placas de Petri com BDA. Em microscópio óptico no aumento de 40X (modelo FWL1500T, Feldmann Wild Leitz) foi localizada a presença de um único conídio sobre a placa, o qual germinou após 13 h de incubação a 25 °C. O único conídio crescido foi imediatamente repicado com o auxílio de uma agulha estéril em uma nova placa de BDA e incubado nas mesmas condições por 20 dias.

3.2.2. Identificação do Isolado

A identificação morfológica do fungo foi realizada por meio de observações de conídios em microscópio óptico e por análise de sintomas em folhas de milho. Foi preparado um esfregaço de hifas com conídios do fungo em lâminas de vidro, proveniente da cultura monospórica com 20 dias de crescimento para a observação. A caracterização morfológica (HIRAN et al., 2015) foi feita com auxílio

da chave de identificação Muchovej, Muchovej e Ribeiro (1988). Uma gota de 10 μ L da suspensão de conídios foi inoculada sobre folhas de milho, em estágio vegetativo V4, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 24 h, e o desenvolvimento da lesão foi acompanhado ao longo do tempo.

O fitopatógeno foi preservado em Castelani, na micoteca Anne Lore Schroeder do Laboratório de Fitopatologia da UFSC. Quando necessário para os experimentos, o fungo foi repicado em meio BDA e as placas incubadas a 25 °C por 7 dias.

3.3. PRODUÇÃO DE CONÍDIOS

Na tentativa de fazer o fungo produzir conídios, foram avaliadas algumas fontes de inóculo:

- a) Grãos de sorgo com fungo *E. turcicum* – Foi preparado o Meio Sorgo adaptado de Piccinin, Di Piero e Pascholati (2005), autoclavando-se 150 g de grãos inteiros de sorgo em 40 mL de água destilada a 121 °C por 20 minutos. A seguir, 5 discos contendo micélio de *E. turcicum* previamente crescidos em BDA, foram repicados para o Meio Sorgo em Erlenmeyer, e incubados em câmara de crescimento no fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro a 25 °C, por 15 dias.
- b) Discos de micélio – Em uma placa de BDA o fungo *E. turcicum* foi repicado e incubado por 7 dias a 25 °C. Foram retirados discos de 8 mm de diâmetro de micélios do fungo.

- c) Suspensão de 10^4 conídios/mL – Foi obtida uma suspensão de conídio de 2 mL conforme o *item 3.2.1.* na concentração de 10^4 conídios/mL.
- d) Folha com sintomas de *E. turcicum* – Foram coletadas folhas com sintomas de *E. turcicum* cultivadas em casa de vegetação.
- e) Folha com sintomas de *E. turcicum* e 10^4 conídios/mL– Folhas sintomáticas cultivadas em casa de vegetação foram pulverizadas com 2 mL de uma suspensão de 10^4 conídios/mL, com o auxílio de um borrifador manual.
- f) Folha com sintomas de *E. turcicum* cultivadas em casa de vegetação sem desinfestação com álcool 70%.

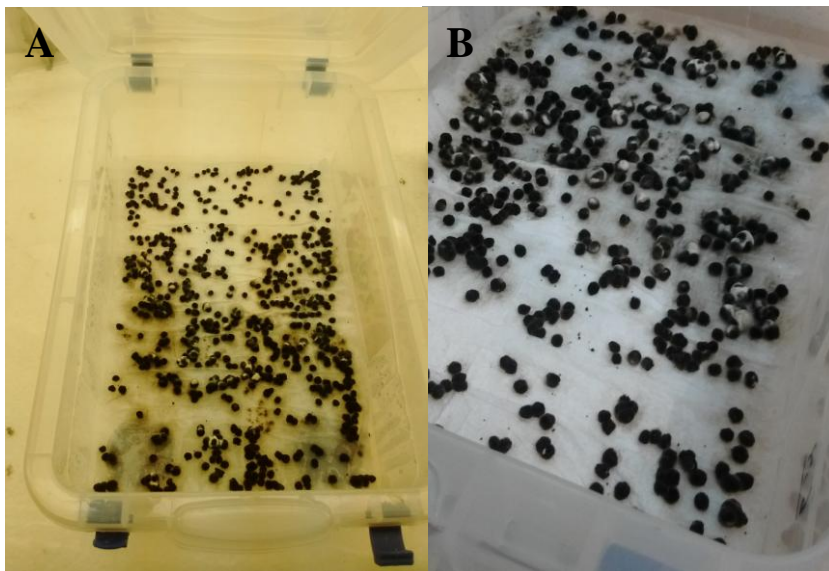
Essas fontes de inóculo foram colocadas sobre folhas de milho ou diretamente (no caso das fontes de inóculo envolvendo folhas de milho) em uma caixa plástica de 5L (34mm x 23mm x 12mm), a qual havia sido desinfestada com hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto, e com etanol 70% por 30 segundos. As caixas foram secas em estufa a 30 °C por 30 minutos. Aproximadamente 8 folhas de milho entre o estágio de desenvolvimento vegetativo V4 e V5 foram desinfestadas com álcool 70% e dispostas no fundo das caixas plásticas com algodão umedecido nas extremidades.

Após a incubação dos materiais a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 h claro e 12 h escuro, foram coletados 7 fragmentos com 3 cm de comprimento de folhas de milho, a partir de cada tratamento. Os fragmentos foram inseridos em tubos Falcon contendo 25 mL de água destilada. Em seguida, foram submetidos à agitação em Vortex por 2 minutos. O material vegetal foi descartado, mantendo somente a

suspensão de conídios. A concentração de conídios foi obtida por meio da média de 6 contagens de cada amostra por tratamento em Câmara de Neubauer. As coletas foram realizadas aos 3, 7, 10 e 13 dias após o início da incubação das caixas plásticas.

Em paralelo, um segundo experimento foi realizado. Nesse caso, grãos de sorgo colonizados pelo fungo *E. turcicum* por 15 dias (conforme item 3.3 a) foram dispostos em caixa plástica de 5L, sobre folhas de papel toalha umedecida (não autoclavado) com água destilada e mantidos em incubação por mais 5 dias a 25 °C, 12 h claro e 12 h escuro (Figura 3). Posteriormente, foram coletados 5 g de grãos de sorgo, realizando-se 6 coletas. Os grãos de sorgo foram inseridos em tubos Falcon contendo 25 mL de água destilada e mantidos sob agitação em Vortex por 1 minuto e filtrado em peneira. A concentração de conídios/mL em suspensão no filtrado foi estimada em câmara de Neubauer e calculada a média entre as 6 coletas realizadas.

Figura 3 - Grãos de sorgo colonizados por *Exserohilum turcicum*, dispostos sobre folhas de papel toalha umedecidas, no interior de caixas plásticas.



Fonte: O autor (2017).

3.3.1. Preparo do inóculo de *E. turcicum*

As suspensões de conídios utilizadas no estudo foram preparadas pelo método de produção de conídios sobre folhas de papel toalha. Para a inoculação do patógeno em plantas de milho, a concentração de conídios foi ajustada em câmara de Neubauer para 10^4 conídios/mL.

3.4. LEVEDURAS

As leveduras utilizadas no presente estudo foram isoladas de folhas de milho coletadas de plantas voluntárias, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, e de folhas de soja do município de Guarapuava, Paraná.

Para tal, foram retirados 5 fragmentos de 4 cm das folhas, que foram imersas em solução de hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto e por 30 segundos em solução de álcool 70%. Os fragmentos foram lavados em água destilada estéril autoclavada, macerados e dispostos sobre 5 placas de Petri com BDA, e incubados a 25 °C, 12 h claro/escuro, por 4 dias. Após crescidas, as colônias foram repicadas em novas placas de Petri com BDA afim de se obter colônias puras (Tabela 1).

Outros isolados provenientes do macerados de frutos de maçãs de diversas localidades do estado de Santa Catarina e leveduras fermentadoras comerciais foram cedidos pelo professor Dr. Marcio Rossi do Laboratório de Bioprocessos da Universidade Federal de Santa Catarina (Tabela 1).

As leveduras foram preservadas em Castellani, em triplicata, posteriormente armazenadas na micoteca Anne Lore Schroeder do Laboratório de Fitopatologia da UFSC. Para realizar a pulverização das plantas, cada levedura foi crescida em placas contendo BDA (25 °C por 72h), as células foram ressuspensas em água destilada estéril, e a concentração das suspensões de células de levedura foram estimadas por meio da contagem de células/mL em câmara de Neubauer.

Tabela 1 - Linhagens de leveduras utilizadas no estudo.

Código	Espécie	Descrição da Fonte de Isolamento / Origem
150	Não Identificado	Macerado de maçãs – Lebon Régis/SC
156	Não Identificado	Macerado de maçãs – Lebon Régis/SC
155	Não Identificado	Macerado de maçãs – Lebon Régis/SC
160	Não Identificado	Macerado de maçãs – Fraiburgo/SC
162	Não Identificado	Macerado de maçãs – Fraiburgo/SC
181	Não Identificado	Macerado de maçãs – Fraiburgo/SC
SG1	Não Identificado	Caules de soja - Guarapuava/PR
SG2	Não Identificado	Caules de soja - Guarapuava/PR
i2	Não Identificado	Folhas de milho - Florianópolis/SC
i5	Não Identificado	Folhas de milho - Florianópolis/SC
i6	Não Identificado	Folhas de milho - Florianópolis/SC
i7	Não Identificado	Folhas de milho - Florianópolis/SC
18	Não Identificado	Folhas de milho - Florianópolis/SC
CCT1	<i>Pichia anomala</i>	Killer K4 – Centro de culturas tropicais André Tosello
CCT2	<i>Candida kefir</i>	Centro de culturas tropicais André Tosello
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Fermol Arôme Plus – AEB Group
SCK	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	kyller - Perlage BB - AEB Group
SB	<i>Saccharomyces baianus</i>	Fermol Charmat – AEB Group
SU	<i>Saccharomyces uvarum</i>	Fermol Cryoaromae – AEB Group

3.5. EFEITO DAS LEVEDURAS SOBRE A SEVERIDADE DA DOENÇA

Inicialmente foi avaliado o efeito de cada levedura sobre a porcentagem de área foliar lesionada por *E. turcicum* (severidade), em plantas de milho cultivar BM 207 Biomatrix®, no estágio de desenvolvimento entre V4 e V5.

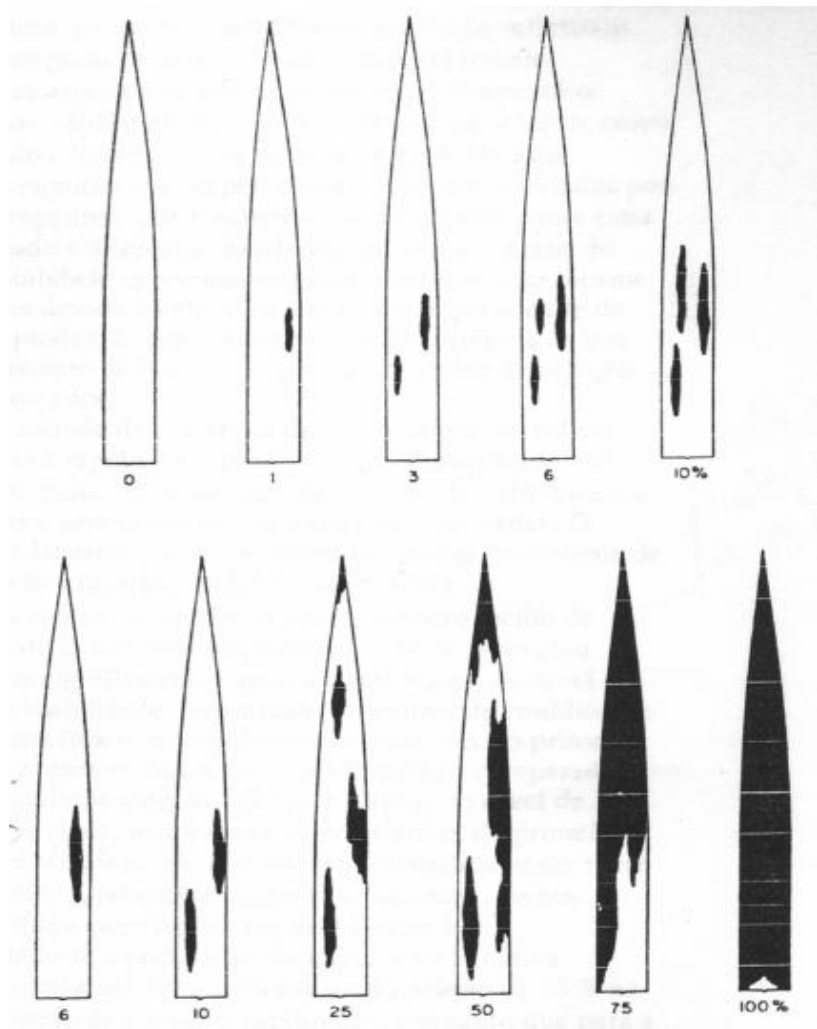
As 19 leveduras obtidas foram crescidas individualmente em BDA por 72 h a 25 °C. Foram preparadas suspensões de células de cada levedura na concentração de 10^8 células/mL. Cada suspensão foi pulverizada sobre as folhas de milho com o auxílio de uma pistola de pintura (LPHV, bico 0,7 mm de diâmetro e pressão máxima de 58 psi,

marca Grifo, Itália), utilizando 5 mL por planta. O controle foi tratado com água destilada. Aos 3 dias após o tratamento (3 DAT), as plantas, com 4 folhas (V4), foram inoculadas com uma suspensão de 10^4 conídios/mL de *E. turcicum*, no volume de 3 mL por planta, e mantidas em câmara úmida por aproximadamente 24 h. Foram realizadas 5 repetições por levedura. Cada repetição foi composta por um vaso com duas plantas compondo uma unidade experimental, e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. O experimento foi realizado duas vezes. O primeiro experimento foi realizado em outubro de 2016 na primavera, a segunda análise foi realizada em fevereiro de 2017, no verão.

Foi avaliada a porcentagem da área foliar lesionada das segundas, terceiras, quartas e quintas folhas de cada planta após 5 dias da inoculação do patógeno, utilizando a escala diagramática elaborada por Bleicher (Figura 4). A porcentagem de redução da severidade da doença em relação a testemunha, foi demonstrada por meio do cálculo:

1 – (Porcentagem da Área Foliar Lesionada do Tratamento ÷ Porcentagem da Área Foliar Lesionada da Testemunha).

Figura 4 –Escala diagramática para avaliação da porcentagem de área foliar lesionada por *Exserohilum turcicum*.



Fonte: Bleicher (1988).

3.6. EFEITO DO INTERVALO DE APLICAÇÃO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DAS PLANTAS

Plantas de milho da cultivar P1630H Pioneer®, no estágio V 4, foram pulverizadas com suspensões das leveduras 181, 155, *Saccharomyces cerevisiae* (SC), i5 e i6 (10^8 células / mL). Após 1, 3 ou 7 dias, as plantas foram inoculadas com o fungo *E. turcicum* na concentração 10^4 conídios / mL.

O tratamento e inoculação das plantas, a câmara úmida, a avaliação da severidade da doença, e o delineamento experimental foram realizados conforme o item anterior.

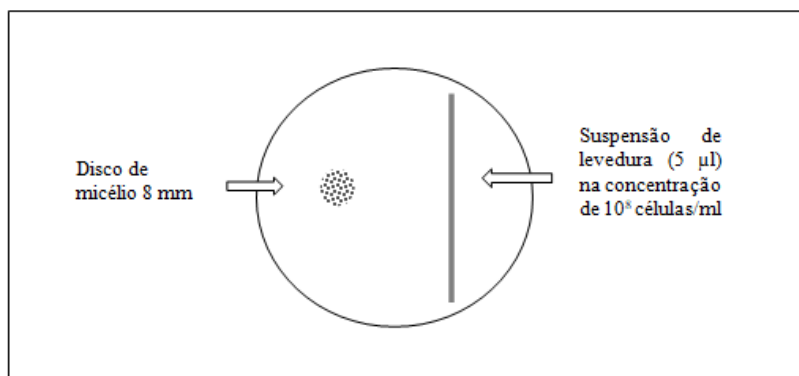
3.7. EFEITO ANTAGONISTA

Suspensões de células das leveduras 181, 155, SC, i5 e i6 em água destilada estéril foram preparadas na concentração de 10^8 células/mL. No lado direito de uma placa Petri com BDA, foram espalhados 5 μ L de uma suspensão de levedura em linha reta (Figura 5). No lado esquerdo da placa (sem leveduras) foi repicado um disco de 8 mm de diâmetro do fungo *E. turcicum* retirado com um perfurador previamente do fungo crescido em BDA durante 15 dias. As placas foram incubadas em câmara de crescimento a 25 °C. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram realizadas 4 repetições por levedura. Cada placa de Petri foi considerada uma unidade experimental. Decorridos 7 dias, foram realizadas medições dos diâmetros das colônias de *E. turcicum* com o auxílio de um paquímetro

digital. A porcentagem de redução do tamanho médio do diâmetro da colônia do patógeno em relação a testemunha, foi demonstrada por meio do cálculo: $1 - (\text{Diâmetro da Colônia do Patógeno em um tratamento} \div \text{Diâmetro da Colônia da Testemunha})$

Para verificar o potencial das leveduras na produção de voláteis antimicrobianos, o experimento foi realizado de forma semelhante ao anterior, mas utilizando placas de Petri subdivididas para impedir o contato físico entre a levedura testada e o organismo alvo.

Figura 5 - Método utilizado para o experimento de antagonismo. Modelo da placa de Petri contendo a levedura confrontada com *Exserohilum turcicum*.



Fonte: O autor (2017).

3.8. ANÁLISE DO PROCESSO INFECIOSO

Plantas de milho P1630H Pioneer® foram cultivadas conforme descrito no item 3.5. Quando apresentavam 4 folhas (estádio V4), as plantas foram pulverizadas com as suspensões das leveduras 181 e i6, na

concentração de 10^8 células/mL (5mL/planta) ou com água destilada (controle). Três dias depois, foi realizada a inoculação do fungo *E. turcicum* (10^4 conídios/mL e 3 mL/planta), e as plantas foram mantidas sob câmara úmida por 24 h em casa de vegetação. Posteriormente (24 horas após a inoculação) foram coletados 4 discos de 1 cm de diâmetro das terceiras e quartas folhas de plantas de milho, compondo uma repetição (uma unidade experimental). Foram realizadas 5 repetições por tratamento e o delineamento experimental foi inteiramente casualizado.

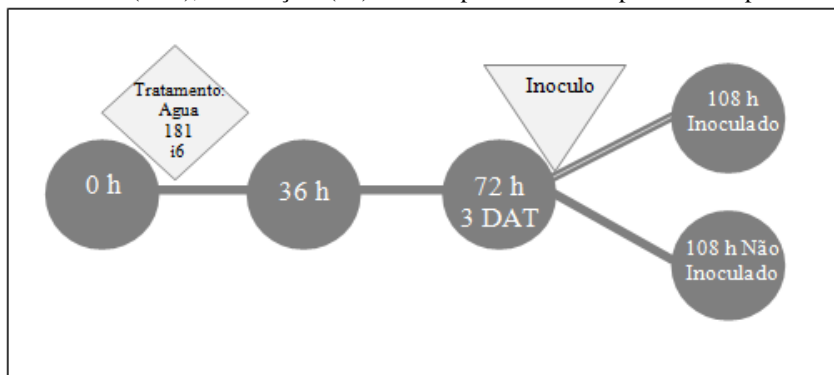
Após a coleta, os discos foliares foram descoloridos conforme metodologia adaptada de Stadnik e Buchenauer (2000). Os discos foliares foram dispostos em placas de Petri de 20 mL com papel filtro no fundo, e foram adicionadas 15 mL de solução de clareamento etanol e ácido acético (3:1, v/v). A solução foi trocada semanalmente até a obtenção do clareamento total dos discos foliares. Foi realizada a contagem de 100 conídios por repetição, considerando-se como germinado quando o tubo germinativo era maior que a largura do conídio. Foi quantificada a porcentagem dos conídios germinados que formaram apressórios e conídios com duplo apressório.

3.9. AVALIAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA EM PLANTAS DE MILHO

3.9.1. Tratamento e coleta de amostras

As plantas de milho da cultivar P1630H Pioneer® foram pulverizadas com suspensões das leveduras 181 ou i6, na concentração de 10^8 células/mL, ou com água destilada como controle. As plantas foram inoculadas com *E. turcicum* 3 dias após os tratamentos. O experimento foi conduzido conforme descrito no item 3.5. totalizando 5 repetições por tratamento com duas plantas por repetição. Foram coletadas da primeira planta do vaso as folhas 1, 2, 3 e 4. Imediatamente após cada coleta, as folhas foram maceradas com nitrogênio líquido em cadinho de porcelana até a obtenção de um pó. As amostras maceradas foram armazenadas em tubo Falcon e mantidas em ultra freezer a -80 °C. Os tempos de amostragem foram 0, 36, 72 e 108 h após a aplicação das leveduras. No tempo 108 h, foram coletadas também amostras de plantas tratadas, mas não inoculadas (Figura 6). Ao completar 5 dias após a inoculação, foi avaliada a porcentagem de área foliar lesionada a partir da segunda planta de cada vaso.

Figura 6 - Amostragem para analisar mecanismos bioquímicos de defesa das plantas tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, com o momento do tratamento (◊), inoculação (▽) e os tempos de coleta representados por ●.



Fonte: O autor (2017).

3.9.2. Determinação do conteúdo de flavonoides

Em amostras equivalentes a 150 mg do macerado de folhas de milho foram adicionados 3 mL de metanol 80% acidificado (metanol: HCL = 80:1, v/v). Essa suspensão foi macerada por 1 minuto, incubada por 1 h no escuro, centrifugada a 20.000 g por 20 minutos a 4 °C, e o sobrenadante (extrato) utilizado. Foram adicionados 42 µL do extrato, 215 µL de etanol 99% e 42 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 2% em poços de placas de poliestireno, as quais foram imediatamente incubadas no escuro, a temperatura ambiente por 1 h.

O teor de flavonoides foi expresso em µg de equivalente de quercetina por g de massa foliar fresca (µg E.Q. g⁻¹ MFF). As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Spectramax®) no comprimento de onda de 420 nm. A curva padrão (Anexo A) foi preparada utilizando quercetina nas concentrações de 0 a 100 µg/mL.

3.9.3. Determinação do conteúdo de proteínas totais e da atividade de enzimas

Amostras equivalentes a 150 mg do macerado de folhas de milho foram misturadas em 1,5 mL de tampão fosfato 100 mM (pH 7,0) contendo os antioxidantes ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) 1 mM de polivinil pirrolidona a 1 % (PVPP). As suspensões foram maceradas por 1 minuto em cadinho de porcelana, centrifugadas a 20.000g a 4 °C por 20 minutos e o sobrenadante (extrato proteico) utilizado nas determinações.

Para determinar o conteúdo de proteínas totais de cada amostra foi empregado o método de Bradford (1976). Em placas de 96 poços foram adicionados 20 µL do extrato proteico e 260 µL do reagente de Bradford diluído (Água : Coomassie Brilliant Blue = 5:1, v/v). As amostras foram submetidas a leituras de absorbância em espectrofotômetro (Spectramax®) no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram expressos pela conversão dos valores das absorbâncias em proteína. A curva padrão (Anexo B) foi preparada utilizando albumina de soro bovino nas concentrações de 0 a 1000µg/mL.

A determinação da atividade de Guaiacol Peroxidase (GPOX) foi adaptada de Hammerschmidt et al., (1982). Em placas de 96 poços, 5 µL do extrato proteico foram adicionados a 295 µL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol 20,2 mM e peróxido de hidrogênio 90 mM. A conversão de guaiacol em tetraguaicol da amostra foi monitorada em espectrofotômetro (Spectramax®) durante 4 minutos e a

densidade ótica (D.O.) foi registrada a cada 30 segundos. O comprimento de onda utilizado foi de 470 nm. Os resultados foram expressos em D.O. a 470 nm por mg de folha por minuto.

Para a determinação de fenilalanina amônia-liase (FAL), o método utilizado foi adaptado de Falcón et al. (2008). Em 50 μL de extrato proteico foram adicionados 450 μL de fenilalanina 50 mM em tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8). As amostras foram incubadas em banho maria a 40 °C por 1 hora. A reação foi interrompida pela adição de 200 μL de HCL 5 N e banho de gelo por 5 minutos. Posteriormente foram adicionados 300 μL de água destilada. A absorbância foi mensurada a 290 nm em espectrofotômetro (Spectramax®). Os resultados foram expressos como nmol de ácido trans-cinâmico formado por mg de proteína. A curva padrão (anexo C) foi preparada utilizando ácido trans-cinâmico nas concentrações de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$.

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

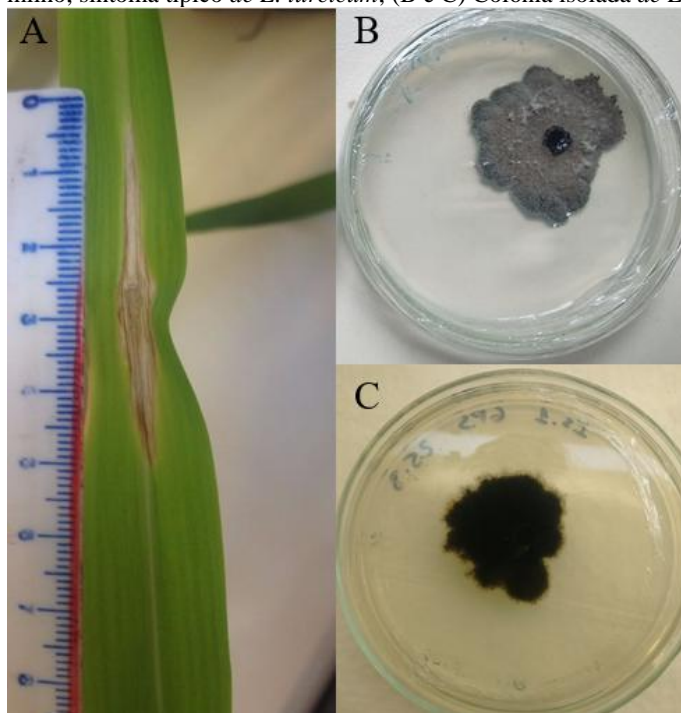
Todos os experimentos *in vitro* e *in vivo* foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ao nível de 5%. Especificamente para a avaliação de mecanismos de defesa em plantas de milho, no tempo 108 h, foi utilizada a análise de variância fatorial ($p < 0,05$) e as médias foram posteriormente analisadas também por meio do teste de Tukey ao nível de 5%. Todas as análises foram realizadas *por meio* do software estatístico TIBCO® Statistica™ 13.3.

4. RESULTADOS

4.1. PATÓGENO

Folhas de milho em V4, quando inoculadas com gotas de 10 μ L da suspensão do isolado monospórico, apresentaram lesões de 5 cm de comprimento 10 dias após a inoculação, com coloração marrom clara e acinzentada, típicas da Helmintosporiose (HIRAN et al., 2015) (Figura 7).

Figura 7 – Lesão e colônia de *Exserohilum turcicum*. (A) lesão em folha de milho, sintoma típico de *E. turcicum*; (B e C) Colônia isolada de *E. turcicum*.

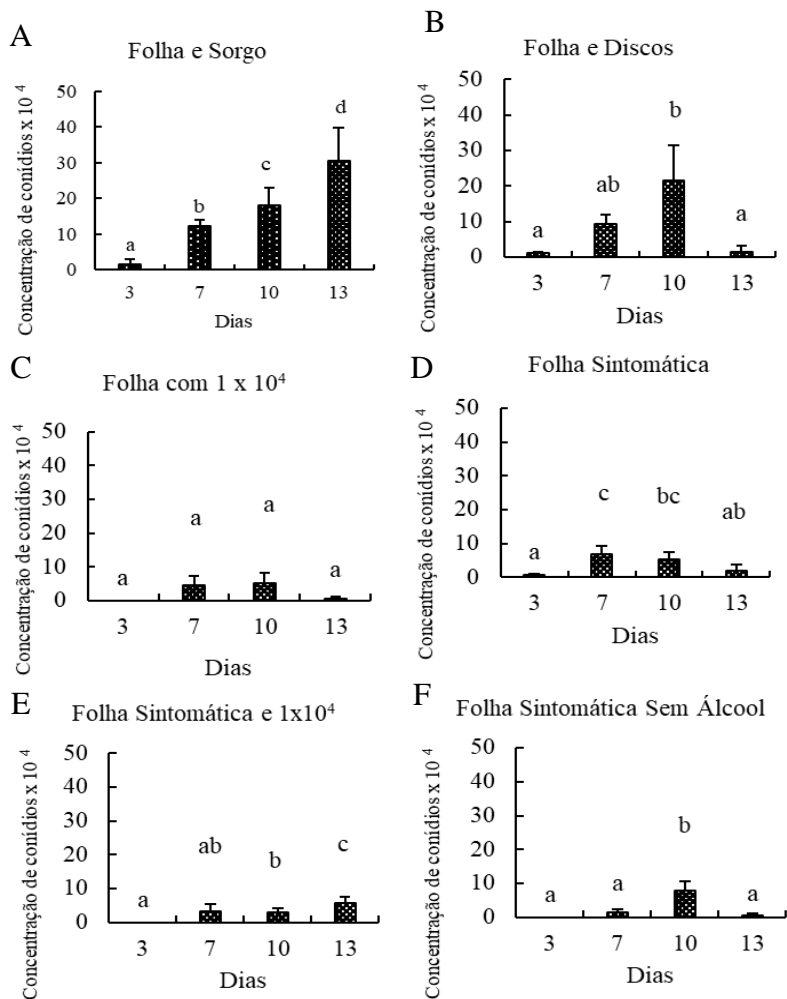


Fonte: A- Giana Paula Schauffler (2017). B, C - Autor (2017).

O método para a produção de conídios a partir de grãos de sorgo colonizados com *E. turcicum* e dispostos sobre folhas de milho, resultou em uma produção crescente ao longo do tempo, sendo contabilizados $1,4 \times 10^4$, $1,2 \times 10^5$, $1,8 \times 10^5$ e $3,0 \times 10^5$ conídios/mL após 3, 7, 10 e 13 dias de incubação, respectivamente (Figura 7 a). Os demais métodos de produção de conídios sobre folhas de milho apresentaram variações ao longo do tempo, e baixa produção de conídios nos primeiros 7 dias, conforme observado nos gráficos da Figura 8.

Já a produção de conídios a partir de grãos colonizados e dispostos sobre folhas de papel toalha umedecidas apresentou-se como o método mais eficaz no processo de produção de conídios de *E. turcicum*. Foi observada a média de 10^8 conídios/mL aos 5 dias de incubação, quantidade superior a todos os métodos anteriormente testados.

Figura 8- Produção de conídios em folhas de milho: A – Grãos de sorgo inoculados com o fungo *Exserohilum turcicum*; B – Discos de micélio de *E. turcicum* crescidos em BDA; C – Suspensão de 10^4 conídios/mL de *E. turcicum*; D – Folhas com sintomas de Helmintosporiose; E – Folhas com sintomas de Helmintosporiose e inoculadas com 10^4 conídios/mL de *E. turcicum*; F – Folha com sintomas de Helmintosporiose sem desinfecção com álcool 70%.



4.2. LEVEDURAS

Ao todo foram selecionadas 19 leveduras para a realização dos experimentos com milho. Dentre essas, foram obtidos 2 isolados de folha de soja, 5 isolados de folhas de milho, 6 isolados de macerados de frutos de maçã e 6 linhagens de leveduras comerciais (Tabela 1).

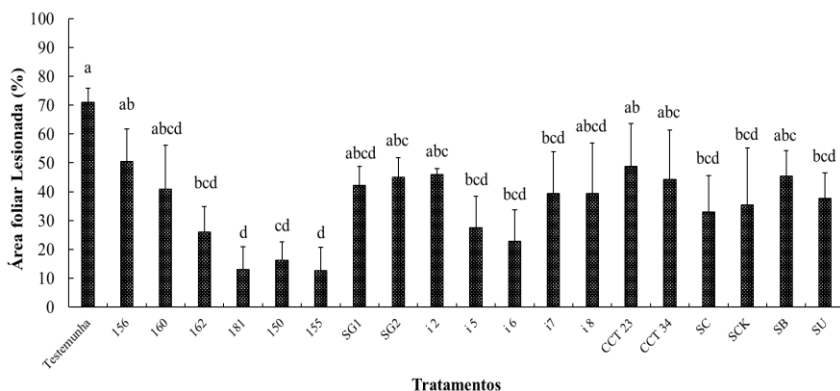
4.3. EFEITO DAS LEVEDURAS SOBRE A SEVERIDADE DA DOENÇA

A análise do efeito das diferentes leveduras sobre a porcentagem de área foliar lesionada por *E. turcicum* foi realizada duas vezes. No primeiro experimento (outubro de 2016), a média de temperatura máxima foi de 26 °C e mínima de 19 °C, a temperatura média do período foi de 22 °C. Já no segundo experimento (fevereiro de 2017), a média de temperatura máxima foi de 37 °C e mínima de 25 °C, a temperatura média do período foi de 31 °C.

No primeiro experimento, entre as 19 leveduras utilizadas, 10 promoveram redução na porcentagem de área foliar lesionada por *E. turcicum* em relação à testemunha (Figura 9). As plantas tratadas com as leveduras 181 e 155, isoladas de macerado de maçã, promoveram 82% de redução da severidade da doença em relação à testemunha. Já para os isolados de folha de milho, como i5 e i6, a redução da severidade da doença foi respectivamente de 61% e 68%. Entre as leveduras

comerciais, *S. cerevisiae* (SC) obteve a maior eficiência, reduzindo em 54% a severidade da doença (Figura 9).

Figura 9 - Efeito da aplicação foliar de leveduras aos 3 dias antes da inoculação do patógeno sobre a severidade da Helmintosporiose em milho, cultivar BM 207 Biomatrix®. Avaliação realizada aos 5 dias após a inoculação (1º experimento). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



No segundo experimento, de maneira geral, a porcentagem de área foliar lesionada foi maior em todos os tratamentos, inclusive na testemunha. Mesmo assim, houve diferença estatística significativa entre os tratamentos. Todas as leveduras testadas promoveram diminuição na área foliar lesionada (Figura 10). Pode-se destacar as leveduras isoladas de macerado de maçã, como a 181 com 58%, e a 155 com 52% de redução na severidade da doença quando comparadas com a testemunha. Entre os isolados de folha de milho, a levedura i5 reduziu 35% e a i6, 49%. A levedura comercial *S. cerevisiae* promoveu 46% de redução na severidade. O isolado SG1 de soja reduziu a severidade em 53%, mas ocorreu apenas nesse segundo experimento.

Figura 10 - Efeito da aplicação foliar de leveduras aos 3 dias antes da inoculação do patógeno sobre a severidade da Helmintosporiose em milho, cultivar BM 207 Biomatrix®. Avaliação realizada aos 5 dias após a inoculação (2º experimento). Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

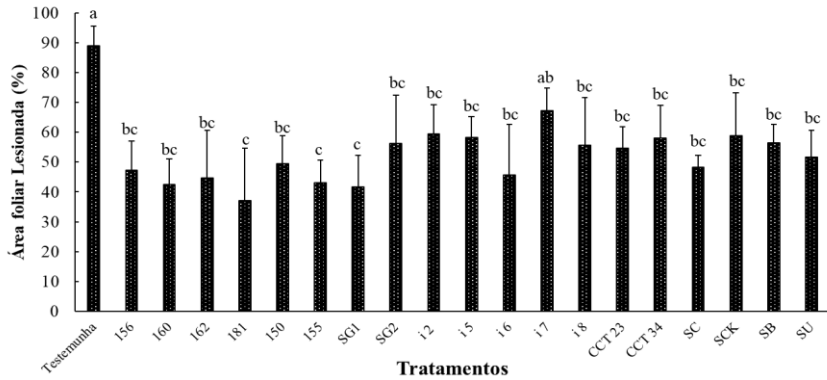
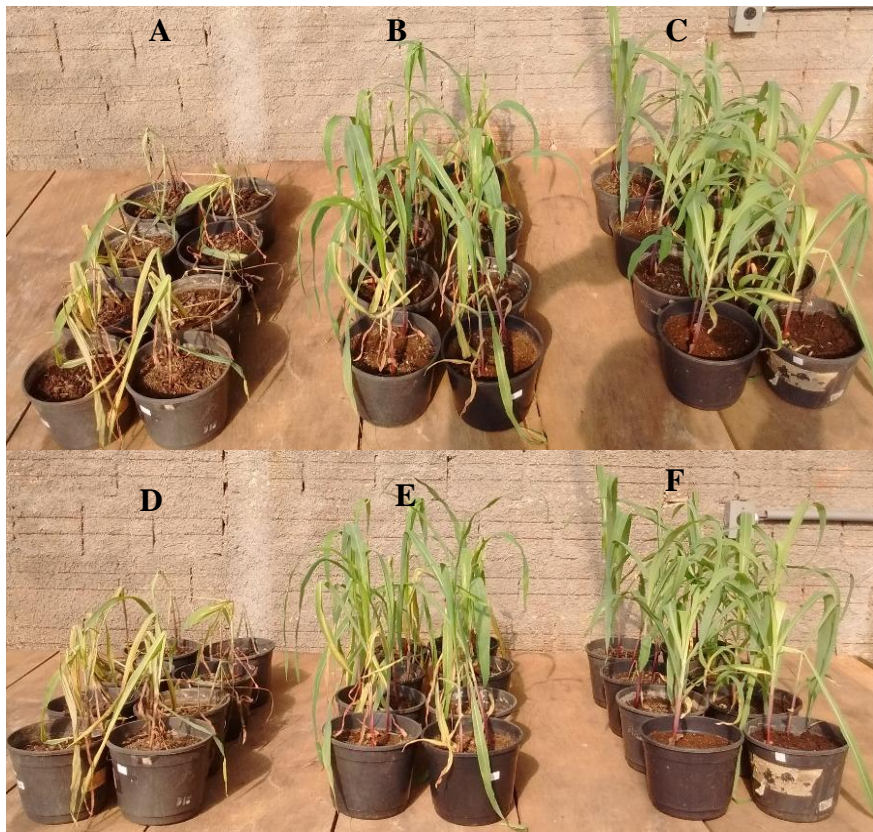


Figura 11 - Efeito da aplicação foliar de leveduras sobre a Helmintosporiose do milho, cultivar BM 207 Biomatrix®, em dois experimentos, aos 10 dias após a inoculação. (A e D) testemunha inoculada com *Exserohilum turcicum* à 10^4 conídios/mL; (B e E) plantas tratadas com leveduras e inoculadas com *E. turcicum* (10^4 conídios/mL); (C e F) testemunhas tratadas apenas com água destilada autoclavada.



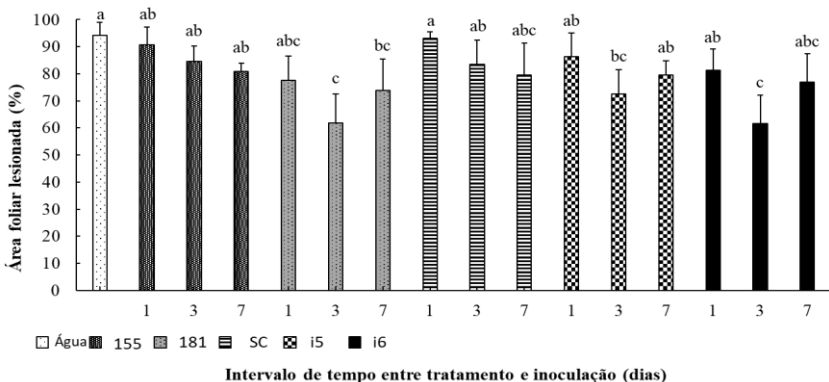
Fonte: O autor (2017).

4.4. EFEITO DO INTERVALO DE APLICAÇÃO DAS LEVEDURAS NA PROTEÇÃO DAS PLANTAS

A análise do efeito do intervalo de tempo entre o tratamento com as leveduras e a inoculação do *E. turcicum*, sobre a porcentagem de área foliar lesionada, foi realizado em setembro de 2017 na primavera, onde a temperatura máxima foi de 33 °C, a mínima de 20 °C, e a temperatura média do período foi de 25 °C.

As plantas de milho tratadas com as leveduras 181, 155, SC, i5 e i6, 3 dias antes da inoculação do patógeno, apresentaram menor severidade da Helminthosporiose. Dentre as leveduras analisadas, o isolado de macerado de maçã 181 e o isolado de milho i6 exerceram maior controle da doença (Figura 12). No geral, nos intervalos de 1 e 7 dias entre tratamento e inoculação, as leveduras não reduziram significativamente a severidade da doença (Figura12).

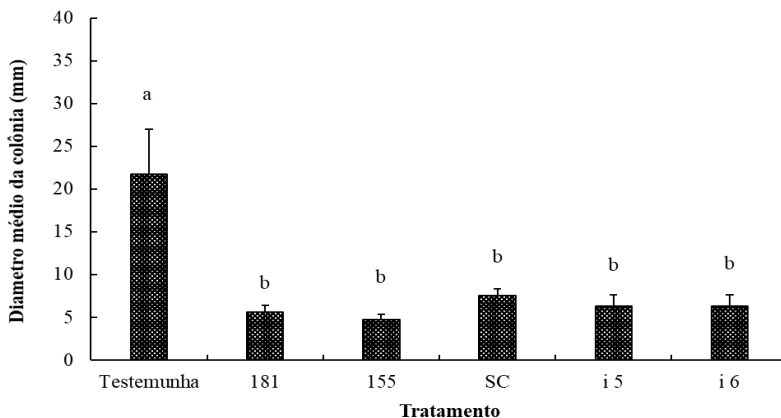
Figura 12 - Efeito do intervalo de tempo entre a aplicação foliar das leveduras e a inoculação com *Exserohilum turcicum* sobre a severidade da Helminthosporiose em milho, cultivar P 1636H Pioneer®. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



4.5. EFEITO ANTAGONISTA

As leveduras testadas reduziram o tamanho médio do diâmetro das colônias do patógeno em relação à testemunha, após 7 dias de incubação (Figura 13). As porcentagens de redução foram similares para as 5 leveduras selecionadas sendo: 52,5% de redução para a levedura 181; 45,8 % para a 155; 40,0% para *S cerevisiae* (Figura 13); 45,6% para a i5, e 48,2% para a i6.

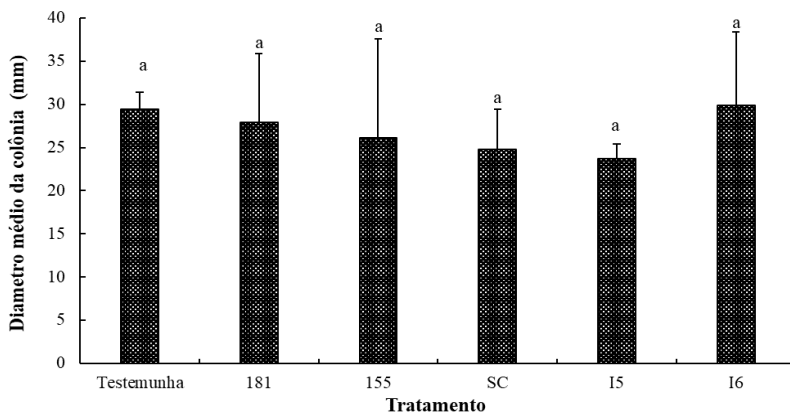
Figura 13 - Diâmetro médio das colônias de *Exserohilum turcicum* confrontado com as leveduras 181, 155, SC, i5 e i6. Avaliação realizada 7 dias após a incubação. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



Com relação à produção de compostos voláteis antimicrobianos, não houve diferença entre o tamanho médio dos micélios expostos às 5 leveduras testadas em relação à testemunha, após 7 dias de incubação, conforme observado na Figura 14. O mesmo experimento foi avaliado

após 15 dias de incubação, e as médias também não diferiram estatisticamente da testemunha.

Figura 14 - Efeito de compostos voláteis das leveduras 181, 155, SC, i5 e i6 sobre o diâmetro médio das colônias de *Exserohilum turcicum*. Avaliação realizada 7 dias após a incubação. Médias seguidas por letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.



Fonte: O autor (2017).

4.6. ANÁLISE DO PROCESSO INFECCIOSO

A porcentagem de germinação de conídios, a formação de apressório simples ou duplo de *E. turcicum* (Figura 15) em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, foram analisadas em dois experimentos distintos. A germinação de conídios de *E. turcicum* sobre folhas de milho previamente tratadas com a levedura 181 apresentou uma redução de 16% em relação à testemunha. No entanto, o tratamento com a levedura i6 não diminuiu a germinação de conídios de maneira significativa (Tabela 2).

A formação de apressórios simples foi menor em plantas tratadas com ambas as leveduras. Nas plantas tratadas com as leveduras i6 e 181, foram observadas reduções de 40% e 77%, respectivamente, no número de apressórios formados em relação à testemunha (Tabela 2).

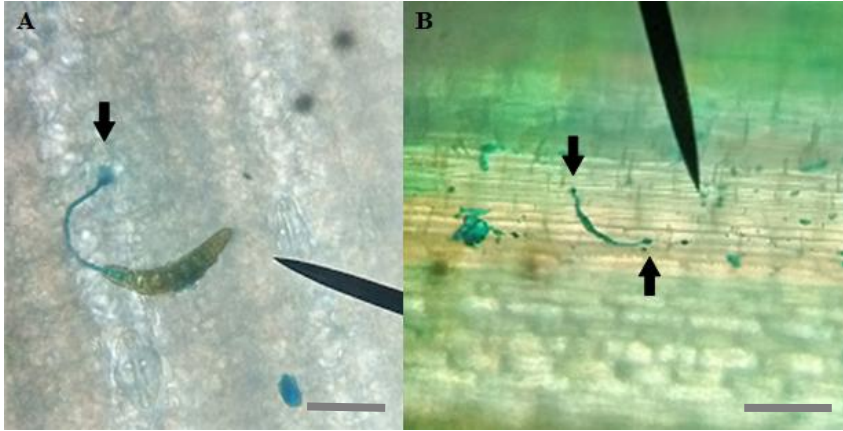
Foi evidenciada a formação de dois apressórios em um único conídio germinado em 11,2% dos conídios em plantas tratadas com água. Em plantas tratadas com as leveduras 181 e i6, ocorreu uma redução significativa na formação de duplos apressórios. Constatou-se uma redução de 88% nos duplos apressórios em plantas tratadas com a levedura i6, e não houve formação de duplo apressório em plantas tratadas com a levedura 181. Em plantas tratadas com as leveduras ocorreu também uma redução na porcentagem da área foliar lesionada, em torno de 39 e 33% de redução na severidade da doença em relação à testemunha, para as leveduras 181 e i6, respectivamente (Tabela 2)

Tabela 2 - Severidade da Helminthosporiose, porcentagem de germinação de conídios e da formação de apressório simples e duplos em conídios germinados do fungo *E. turcicum* sobre a folhas de milho cultivar P 1636H Pioneer®, em plantas previamente tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada. Avaliação microscópica e da severidade da doença realizadas 24 h e 120 h após a inoculação, respectivamente.

Tratamento	Germinação	Apressório	Duplo Apressório	% de área foliar lesionada
Água	89,8% ±8,3 a	72,5% ±17,1a	11,2% ±7,3 a	79,6% ±4,3 a
i6	80,8% ±6,1 ab	43,8% ±15,1b	1,4% ±2,2 b	54,3% ±3,7 b
181	75,2% ±8,2 b	16,8% ±6,5 c	0% ±0 b	48,3% ±9,8 b

*Médias seguidas por letras minúsculas iguais, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5%. Resultados representam a média de dois experimentos.

Figura 15 - Conídios de *Exserohilum turcicum* germinados sobre folhas de milho apresentando apressório eminente, 24 h após a inoculação das plantas. (A) Conídio com um apressório 50 μm (Aumento 60 X). (B) Conídio com formação de duplo apressório 100 μm (Aumento 40 X). Setas indicam o apressório.



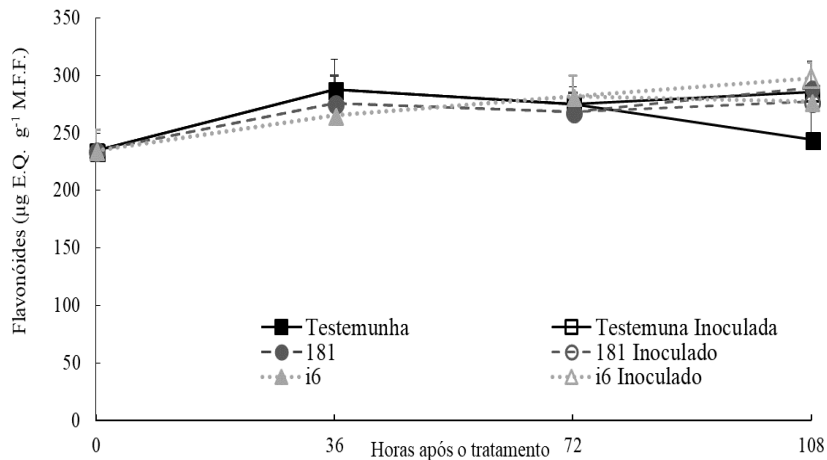
Fonte: O autor (2018).

4.7. ENSAIOS BIOQUÍMICOS REALIZADOS EM PLANTAS DE MILHO

4.7.1. Flavonoides

Não foi possível detectar diferenças no conteúdo de flavonoides entre as plantas tratadas com as leveduras 181, i6 e água destilada em todos os tempos de coleta analisados. Também não houve efeito da inoculação (Figura16).

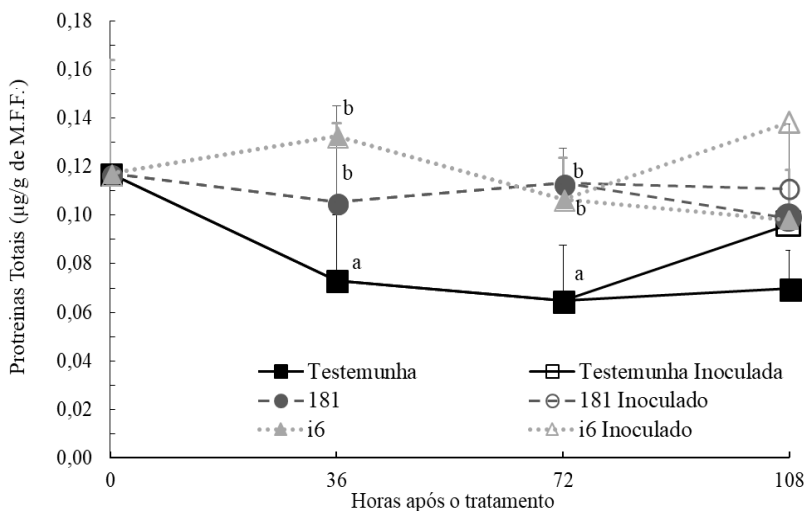
Figura 16 - Conteúdo de flavonoides em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Resultados expressos em μg de equivalente de quercetina (E.Q.) por g de massa foliar fresca (M.F.F.) Plantas inoculadas aos 3 DAT.



4.7.2. Proteínas totais

No presente estudo, verificou-se que plantas tratadas com as leveduras 181 e i6, apresentaram aumento na concentração de proteínas totais em relação a plantas tratadas com água destilada, nos tempos de coleta de 36 e 72 h. Entretanto, não ocorreu diferença significativa na quantidade de proteínas totais nos tempos de 108 h e entre plantas inoculadas e não inoculadas com *E. turcicum* (Figura 17)

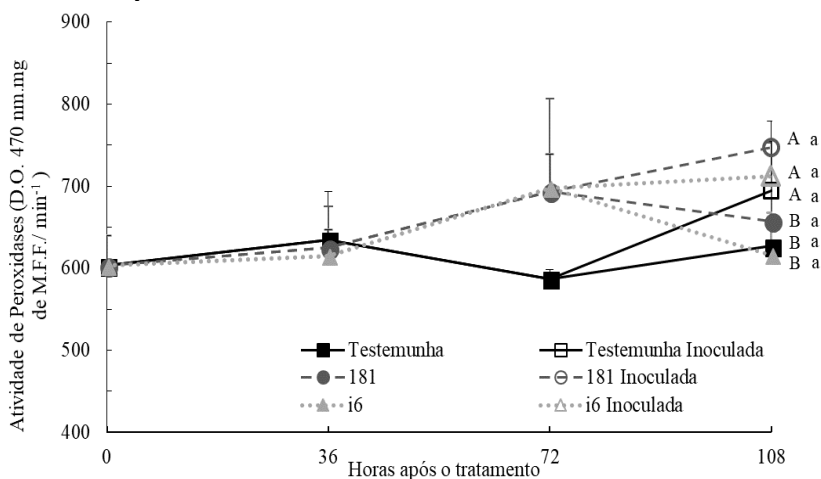
Figura 17 - Concentração de proteína total ($\mu\text{g}/\text{mL}$) em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Médias seguidas por letras minúsculas iguais, em um mesmo tempo amostral, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a 5% Plantas inoculadas aos 3 DAT.



4.7.3. Guaiacol Peroxidase

A atividade da guaiacol peroxidase foi maior em plantas inoculadas com o patógeno, independente do tratamento previamente aplicado, 36 horas após a inoculação. Por outro lado, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos por meio do teste de Tukey ao nível de 5% (Figura 18).

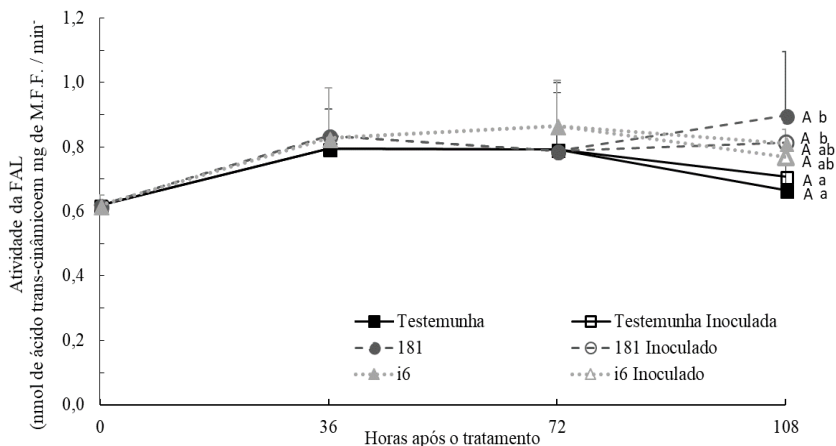
Figura 18 - Atividade de guaiacol peroxidases em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Letras minúsculas iguais, em um mesmo tempo amostral, indicam não haver diferenças entre tratamentos; letras maiúsculas iguais indicam não haver diferenças entre plantas inoculadas ou não (dentro do mesmo tratamento), pelo teste de Tukey a 5%. Plantas inoculadas aos 3 DAT.



4.7.4. Fenilalanina amônia-liase - FAL

Não se constatou interação entre plantas inoculadas com o *E. turcicum* e não inoculadas, por meio da ANOVA fatorial ($p < 0,05$), no entanto foi possível verificar efeito do tratamento, onde plantas tratadas com a levedura 181 independente da inoculação, apresentaram maior atividade cinética da fenilalanina amônia-liase em relação a testemunha tratada com água destilada, 36 horas após a inoculação (Figura 19).

Figura 19 - Atividade de fenilalanina amônia-liase, em folhas de milho tratadas com as leveduras 181, i6 ou água destilada, inoculadas ou não com *Exserohilum turcicum*. Letras minúsculas iguais, em um mesmo tempo amostral, indicam não haver diferenças entre tratamentos; letras maiúsculas iguais indicam não haver diferenças entre plantas inoculadas ou não (dentro do mesmo tratamento), pelo teste de Tukey a 5%. Plantas inoculadas aos 3 DAT.



5. DISCUSSÃO

A Helmintosporiose está presente na maioria das lavouras de milho no Brasil e, se não controlada, pode acarretar em perdas de até 50% da produção. Basicamente, o controle da Helmintosporiose é feito por meio da utilização de cultivares resistentes e do uso de fungicidas. Todavia, métodos alternativos vêm sendo estudados a fim de possibilitar novas ferramentas para o controle dessa doença, que sejam menos nocivas ao ser humano e ao meio ambiente. Assim, o uso de leveduras pode se tornar uma ferramenta alternativa ao controle convencional da Helmintosporiose.

Uma primeira etapa no estudo de leveduras como ferramenta para o controle da Helmintosporiose em milho é a produção de inóculo do fitopatógeno, o qual necessita ser constituído por conídios viáveis e homogêneos. Métodos distintos para produção de conídios desse fungo são descritos na literatura. Silva et al. (2017) obtiveram conídios de *E. turcicum*, isolado de plantas no estado de Tocantins, em concentrações superiores a 10^6 conídios/mL, cultivando o fungo sobre BDA em placas incubadas por 15 dias, com iluminação por 12 h diárias. Já Sartori et al. (2017) utilizaram a mesma metodologia com *E. turcicum* isolado em Córdoba na Argentina, mas foram necessários 30 dias de incubação para permitir a produção de uma concentração significativa de conídios. Fica evidente que diferentes isolados do fitopatógeno possuem necessidades distintas ao serem induzidos a produzirem conídios. Segundo a literatura, os fatores que induzem a esporulação ainda não são bem elucidados sob as condições de cultivo em laboratório (LEVY; PATAKY, 1992; NWANOSIKE; MABAGALA, 2017).

No presente estudo, o isolado de *E. turcicum* não produziu conídios quando cultivado em BDA, levando à necessidade de avaliar outros métodos. Entretanto, o método de produção de conídios a partir de grãos de sorgo colonizados e dispostos sobre folhas de papel toalha umedecidas, no interior de caixa plástica com elevada umidade relativa, garantiu uma alta produção de conídios. Além de manter o inóculo livre de contaminantes, o método se destacou dos demais testados no estudo pela praticidade e rapidez no processo.

Para Takikawa et al. (2011), é importante utilizar conídios totalmente maduros e com alta germinação nesse tipo de experimento, a fim de garantir a homogeneidade das amostras e sucesso na infecção do hospedeiro pelo fitopatógeno. Essas especificações foram garantidas, pois o fungo apresentou taxa de 89,8% de germinação dentro de 24 h após a inoculação, demonstrando homogeneidade, viabilidade e alta germinação dos conídios. Isso se deve ao método de produção de conídios sobre folhas de papel toalha, onde após 5 dias de incubação, os grãos de sorgo já tomados pelo fungo foram capazes de produzir conídios de maneira homogênea e viáveis para a inoculação em plantas de milho.

A partir dos experimentos de proteção, observou-se que a maioria das leveduras estudadas exerceram um grau de controle sobre a Helmintosporiose, desempenhando funções de agente de biocontrole. Os mecanismos usados por leveduras antagonistas, segundo a literatura, podem ter forma variada e ação combinada a outros mecanismos de defesa, para inibir os fitopatógenos em plantas.

Primeiramente foi evidenciado o efeito das leveduras na redução da área foliar lesionada pelo fungo *E. turcicum*, demonstrando-se que

mesmo ao realizar um screening com um baixo número inicial de leveduras ($n = 19$), foi possível selecionar indivíduos com amplo potencial para controlar a Helmintosporiose na cultura de milho, sob condições de casa de vegetação, ao contrário de Sartori et al. (2015), que com o intuito de obter potenciais controladores biológicos do *E. turcicum* para a cultura do milho, testaram centenas de isolados bacterianos contra o fitopatógeno, e isolaram 11 indivíduos com potencial de biocontrole para essa doença. A grande maioria dos trabalhos descreve o uso de bactérias como agente de biocontrole para Helmintosporiose em milho, e o atual estudo representa um dos poucos que procurou selecionar leveduras antagonistas a *E. turcicum* (LINDOW; BRANDL, 2003; STROMBERG; KINKEL; LEONARD, 2004; WANG et al., 2009; PEÑUELAS et al., 2012; SARTORI et al., 2017).

É descrito na literatura que a superfície da folha consiste em um ambiente extremo para comunidades microbianas, sofrendo a interferência de vários fatores que podem influenciar no habitat dessas populações de microrganismos. A filosfera é constantemente exposta a variações repetidas na temperatura e umidade relativa, devido à radiação solar, chuva, formação de orvalho e alterações fisiológicas da própria planta, como a abertura e fechamento de estômatos para controle da pressão osmótica. Esses fatores influenciam diretamente na colonização e fixação da filosfera por microrganismos pulverizados sobre as folhas (WILSON; HIRANO; LINDOW, 1999; MERCIER; LINDOW, 2000; LINDOW; BRANDL, 2003).

Foi observado neste estudo, que ao se avaliar o efeito de diferentes leveduras sobre a severidade da doença na primavera e no

verão, o controle exercido pelas leveduras se deu de maneiras distintas, sugerindo que a temperatura influencia no estabelecimento dessas na filosfera e no desenvolvimento da doença. Desse modo, o maior nível de controle da Helmintosporiose exercido pelas leveduras no experimento onde as temperaturas médias foram menores, pode ter ocorrido pela maior taxa de sobrevivência e ou multiplicação nesse ambiente. Já o número de leveduras que controlaram a doença foi menor que no segundo experimento, onde foram registradas temperaturas mais elevadas. Neste experimento, todas as leveduras utilizadas diferiram estatisticamente em relação à testemunha, controlando a doença, mas em menor porcentagem de controle.

O isolado de *E. turcicum* utilizado neste estudo apresentou maior capacidade de infecção quando inoculado na época mais quente. Foi observada, no primeiro experimento (temperatura média de 22 °C), uma menor porcentagem de área foliar lesionada na testemunha (71%) em relação ao segundo experimento (89% - temperatura média de 31 °C). Pode-se então sugerir que no primeiro experimento as leveduras possuíram uma peculiar vantagem sobre o fungo, devido à temperatura mais amena que possibilitou o melhor estabelecimento na filosfera, ao mesmo tempo em que desfavoreceu o crescimento do patógeno, resultando em maior nível de proteção das plantas. É sabido que diferentes isolados de *E. turcicum* podem ter diferentes faixas de temperatura ideal para o seu crescimento. Sendo assim, sugere-se que estudos sobre a temperatura, ideal de crescimento deste isolado de *E. turcicum* sejam realizados em trabalho futuros com a intenção de corroborar com essa hipótese.

Outro fator que já foi elucidado por Beattie e Lindow (1999), se

faz considerável no presente estudo, é que as leveduras não passaram por nenhum processo de adaptação fisiológica para tolerar as condições ambientais adversas da filosfera onde foram inoculadas, o que pode limitar o tempo de permanência dessa população na folha. Isso poderia explicar a falta de controle exercido pelas leveduras quando aplicadas sobre as plantas 7 dias antes da inoculação, onde somente a levedura 181 controlou a doença, ainda assim em baixo nível, quando comparado ao intervalo de 3 dias entre o tratamento e inoculação, que foi o mais eficaz para controlar a doença. Ao avaliar o efeito de 8 bactérias isoladas de milho em Córdoba na Argentina como agentes de biocontrole da Helmintosporiose, Sartori et al. (2017) demonstraram que os isolados aplicados 10 dias após a inoculação reduziram entre 23 % e 52% a severidade da doença em milho. Observaram também que houve sobrevivência prolongada das bactérias inoculadas, dado obtido por meio de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) presentes nas folhas do milho em até 39 dias após o tratamento com os isolados. Os autores atrelaram a sobrevivência prolongada dessas bactérias à capacidade de adaptação que os isolados possuíram ao colonizar a filosfera. Os dados apresentaram correlação negativa entre a quantidade de bactérias antagonistas e o crescimento do patógeno nas folhas do milho.

Na literatura, vários autores demonstraram que o controle biológico empregando leveduras antagonistas atua na redução do tamanho da população de patógenos sobre as folhas, o que poderia estar ocorrendo por antibiose e principalmente por competição. Esta redução está correlacionada com a diminuição dos sintomas causados pela doença nas folhas, pois as leveduras são ótimos competidores por açúcar

na filosfera da maioria das espécies cultivadas, e possuem a capacidade de produzir compostos antimicrobianos. Sendo assim o uso de leveduras representa uma alternativa no controle de fitopatógenos (NEWTON et al., 1997, 1998; BEATTIE; LINDOW, 1999; LINDOW; BRANDL, 2003; STROMBERG; KINKEL; LEONARD, 2004; MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

As leveduras 181, 155, SC, i5 e i6 diminuíram o tamanho médio da colônia do fitopatógeno *in vitro*, mas não produziram compostos voláteis com efeito antimicrobiano. Estudos demonstram que leveduras podem inibir o crescimento de fitopatógenos por meio da secreção e difusão de compostos antimicrobianos no meio, como etanol, killer toxinas, enzimas que degradam a parede celular de fitopatógenos (β -1,3-glucanase, exochitinase, endo-chitinase), e enzimas líticas de diversos grupos (HUANG et al., 2011; LUTZ et al., 2013; RIMA; STEVE; ISMAIL, 2012; MUCCILLI; RESTUCCIA, 2015).

No presente trabalho constatou-se inibição do crescimento micelial e a diminuição da área foliar lesionada pelo *E. turcicum* por meio do uso de leveduras como agentes de biocontrole, porém não foi possível identificar se o controle se deu por meio de competição por espaço e nutrientes entre a levedura e o fitopatógeno, ou se as leveduras secretaram compostos antimicrobianos. Assim, se faz necessário realizar novos estudos, com o objetivo de buscar possíveis compostos antimicrobianos produzidos pelas leveduras que possam inibir o crescimento micelial do *E. turcicum* sobre as folhas de milho quando tratadas com essas leveduras.

A redução na germinação de conídios e a diminuição do número de apressórios são efeitos do antagonismo exercido por leveduras contra

fitopatógenos (ZHANG; ZHANG; PING, 2005). Entretanto, no presente estudo, somente a levedura 181 promoveu uma pequena redução na média de germinação de conídios em relação à testemunha. Por outro lado, as leveduras 181 e i6 diminuíram drasticamente a formação de apressórios simples e duplos nos conídios germinados de *E. turcicum* sobre as folhas de milho, assim como a porcentagem de área foliar lesionada pelo fitopatógeno. Na literatura pouco é descrito sobre o processo infeccioso de *E. turcicum* e a influência da formação de apressório na capacidade do fitopatógeno adentrar e colonizar a célula do hospedeiro. Entretanto, a formação de apressório é descrita como o mecanismo chave na infecção de plantas por fitopatógenos, pois permite a penetração direta por meio da cutícula do hospedeiro e garante a sustentação do fitopatógeno sobre a folha (PASCHOLATI, 2011).

Se por um lado a antibiose ou competição poderiam estar envolvidos no controle da doença, via redução na formação de apressórios pelo fitopatógeno, por outro sabe-se que leveduras apresentam constituintes da parede celular que funcionam como elicitores de mecanismos de defesa de plantas. Labanca (2002) descreve a presença de dois elicitores na parede de *S. cerevisiae*, que podem ser extraídos por um processo simples de autoclavagem. O autor sugere que um deles seja uma manana, e descreve que plantas de pepino tratadas com esses elicitores tiveram a atividade de peroxidases elevada e exibiram aumento na resistência contra *Colletotrichum lagenarium*.

As plantas dispõem de diversas estratégias e mecanismos para se proteger do ataque de fitopatógenos, onde alterações fisiológicas ocorrem durante o processo infeccioso. Entre elas, estão os mecanismos bioquímicos de defesa das plantas, como a produção de metabólitos

secundários e enzimas (PASCHOLATI, 2011). No presente estudo, a quantidade de proteínas totais foi maior nas folhas de milho tratadas com as leveduras, as quais haviam sido lavadas antes da extração proteica, assim evidenciando-se que o tratamento à base das leveduras 181 e i6 alteraram os metabólitos proteicos em tecidos de folhas de milho. Somado a isso, o aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas com a levedura 181 dão indícios de uma possível indução de resistência nas plantas.

Sabe-se que as plantas possuem a capacidade de resistir a doenças foliares pelo aumento na atividade de diversas enzimas, entre elas a fenilalanina amônia-liase. Isso se dá pelo fato de sua atividade estar envolvida nas primeiras respostas de defesa das plantas contra o ataque de fitopatógenos (DIXON; PAIVA, 1995; ALMEIDA; BARBOSA; MARQUES, 2012). A enzima está envolvida na síntese de lignina, que contribui para o enrijecimento da parede celular dos vegetais, dificultando a ação de toxinas e protease, glucanases e catalases produzidas pelos patógenos com a função de romper a parede celular dos vegetais ou facilitar a penetração de hifas provenientes da germinação de esporos de fungos fitopatogênicos (DIXON; PAIVA, 1995; GERASIMOVA; PRIDVOROVA; OZERETSKOVSKAYA, 2005; PASCHOLATI, 2011). Almeida, Barbosa e Marques (2012), ao estudar o patossistema soja e *Phakopsora pachyrhizi* (ferrugem asiática), constataram que a cultivar Embrapa 48 apresentou aumento da atividade da fenilalanina amônia-liase como resposta de defesa após a inoculação do patógeno.

Alterações na atividade de algumas proteínas, como enzimas do grupo de peroxidases, estão envolvidas na expressão de resistência entre

o hospedeiro durante o processo infeccioso e são utilizadas como indicadores de defesa de plantas (BOAVA et al., 2010; PASCHOLATI, 2011). No presente estudo, verificou-se aumento da atividade da peroxidase em plantas inoculadas com *E. turcicum*, e os resultados indicaram que o tratamento à base de leveduras não teve efeito no aumento da atividade de peroxidase em plantas de milho. Ao contrário do observado por Roncatto e Pascholati (1998), que sugerem que metabólitos produzidos por *S. cerevisiae* e estruturas da parede celular dessa levedura podem agir como elicitores de respostas de defesa em milho e sorgo, promovendo alteração na atividade e no padrão eletroferético da enzima peroxidase 48 horas após o tratamento das plantas com suspensão de células da lavoura.

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que as leveduras 181 e i6 possuem potencial para atuarem como agentes de controle biológico da Helmintosporiose, pois exerceram redução na severidade da doença, tendo diminuído o tamanho da colônia de *E. turcicum* e principalmente reduzido a formação de apressórios *in vivo*. Os aumentos na quantidade de proteínas totais e na atividade da fenilalanina amônia-liase em plantas tratadas com a levedura 181 indicam uma possível indução de resistência.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, duas leveduras mostraram potencial de biocontrole da Helmintosporiose do milho, atuando diretamente sobre o patógeno (redução na formação de apressórios durante o processo infeccioso *in vivo* e no tamanho da colônia de *E. turcicum*) e indiretamente sobre a planta (elevação na quantidade de proteínas totais e na atividade de fenilalanina amônia-liase).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. D. O.; MARQUES, A. E. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 47, n. 2, p. 163–172, 2012.
- ALVES, S. P. L. **Marketing Verde e os Desafios na Preservação do Cerrado**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2014.
- BARROS, J. F. C; CALADO, J. G. **A cultura do milho**. Universidade de Évora, 2014.
- BAR-SHIMON, M. et al. **Characterization of extracellular lytic enzymes produced by the yeast biocontrol agent *Candida oleophila***. **Current Genetics**, v. 45, n. 3, p. 140–148, 2004.
- BEATTIE, G. A.; LINDOW, S. E. Bacterial Colonization of Leaves: A Spectrum of Strategies. **Phytopathology**, v. 89, n. 5, p. 353–359, 1999.
- BIOMERCADO. **Centro de Referência da Cadeia de Produção de Biocombustíveis para Agricultura Familiar**. Disponível em <<http://biomercado.com.br/>>. Acesso em: 10 de março 2018.
- BLEICHER, J. **Níveis de resistência a *Helminthosporium turcicum* pass. em três ciclos de seleção em milho pipoca (*Zae mays L.*)**. Piracicaba, 1988. 130p. Tese de doutorado (Doutorado em Agronomia) – ESALQ – SP, 1988.
- BOAVA, L. P et al. **Efeito de indutores bióticos e abióticos na atividade de quitinase e peroxidase e no controle da ferrugem causada por *Puccinia psidii* em eucalipto**. **Summa Phytopathol.**, v. 36, n. 2, p. 168–172, 2010.
- BOLD, H.C. 1972. **O reino vegetal**. Editora Edgard Blucher Ltda. e Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

BOLLER, T. Chemoperception of microbial signals in plant cells. **Plant Molecular Biology**, v.46, p.189-214, 1995.

BONALDO, S.M. **Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na síntese de fitoalexinas em sorgo, na germinação e formação de apressórios por fungos fitopatogênicos e na proteção de pepino a *Colletotrichum lagenarium* e sorgo a *Colletotrichum sublineolum***. 2005. 150p. Tese (Doutorado em Agronomia) Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CARSON, M.L.; VAN DYRE, C.G. Effect of light and temperature on expression of partial resistance of maize to *Exserohilum turcicum*. **Plant Disease**, v.78, n.5, p. 519-522, 1994.

CARVALHO, N. L. Resistência Genética Induzida Em Plantas Cultivadas. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v. 7, nº 7, p. 1379-1390, Mar-Ago. 2012.

CASELA, C. R.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; PINTO, N. F. J. A. Doenças na cultura do milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. N 83, 2006. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/490415/1/Circ83.pdf>>. Acesso em: 28 Fevereiro 2018.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de Frutas e Hortaliças: Fisiologia e Manuseio**. Lavras: UFLA. 738 p. 2005.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Diretoria de Política agrícola e Informações. **Indicadores da Agropecuária**. Observatório Agrícola. n.1, p. 1-115, 2018. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 23 de fevereiro 2018.

CONAB, Companhia Nacional de Abastecimento. Diretoria de Política agrícola e Informações. **Perspectivas para a agropecuária**. Safra 2017/2018. v.5, p. 1-111, 2017. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 08 de março 2018.

DA SILVA, S.R.; PASCHOLATI, S.F. *Saccharomyces cerevisiae* protects maize plants, under greenhouse conditions, against *Colletotrichum graminicola*. **Journal of Plant Disease and Protection** . v. 99, p. 159-167. 1992.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, v. 30, p. 243–250, 2004.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. **The Plant Cell**, v. 7, n. July, p. 1085–1097, 1995.

EL-TARABILY, K. A. Suppression of *Rhizoctonia solani* diseases of sugar beet by antagonistic and plant growth-promoting yeasts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 69–75, 2004.

FALCÓN, A. et al. The effect of size and acetylation degree of chitosan derivatives on tobacco plant protection against *Phytophthora parasitica* nicotianae. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.24, p.103–112, 2008.

FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA de E. **Principais doenças na cultura do milho**. Embrapa, 2000. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/861158>>. Acesso em: 15 Jan. 2018.

FIGUEIREDO, M. et al. Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo. In: **Congresso Nacional de Milho e Sorgo**. Goiânia: ABMS, 2010.

FILIPPI, M.C.C., SILVA, G.B; PRABHU, A.S. Indução de resistência à brusone em folhas de arroz por isolado avirulento de *Magnaporthe oryzae*. **Fitopatologia Brasileira** v. 32, n° 5, p. 387-392, 2007.

GARCIA, J. C.; MATTOSO, M. J.; DUARTE, J. O. Importância do milho em Minas Gerais. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.27, n.233, p.7-12. 2006.

GERASIMOVA, N. G.; PRIDVOROVA, S. M.; OZERETSKOVSKAYA, O. L. Role of L -Phenylalanine Ammonia Lyase in the Induced Resistance and Susceptibility of Potato Plants. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 103–105, 2005.

GUIOMAR, P. M. C. N. **Avaliação do comportamento de cultivares de milho na presença da helmintosporiose causada por *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs**. 2011. 92 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.

HAMMERSCHMIDT, R.; NUCKLES, E. M. J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v.20, p 73-82, 1982.

HIRAN, A. A. et al. Towards a natural classification and backbone tree for Pleosporaceae. **Fungal Diversity**, v. 74, n. 1, p. 199–266, 3 set. 2015.

HUANG, R. et al. Control of Postharvest *Botrytis* Fruit Rot of Strawberry by Volatile Organic Compounds of *Candida intermedia*. v. 101, n. 7, p. 859–869, 2011.

KOCH, W.; WAGNER, C.; SEITZ, U. Elicitor-induced cell death and phytoalexin synthesis in *Daucus carota* L. **Plant Pathology**, v.206, p.523-532, 1998.

LABANCA, E. R. G. **Purificação parcial de Elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: Atividade como Indutores de Resistência em Pepino (*Cucumis sativus*) Contra *Colletotrichum lagenarium* e da Síntese de Glicolinas em Soja (*Glycine max*)**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

LACAZ, C.S.; MINAMI, P.S. & PURCHIO, A. **O grande mundo dos fungos**. EDUSP, São Paulo, SP, Brasil. 1970.

LENNÉ, J. M.; TRUTMANN, P. **Diseases of tropical pasture plants**. Wallingford, Oxon, UK: CBA International, p. 404. 1994.

LEVY, Y. Variation in Fitness Among Fields isolation of *E. turcicum* in Israel. **Plant Disease**, v. 75, p. 173–166, 1991.

LEVY, Y.; PATAKY, J. K. Epidemiology of Northern Leaf Blight on Sweet Corn. **Phytoparasitica**, v. 20, n. 1, p. 53–66, 1992.

LINDOW, S. E.; BRANDL, M. T. MINIREVIEW Microbiology of the Phyllosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 1875–1883, 2003.

LUTZ, M. C. et al. Efficacy and putative mode of action of native and commercial antagonistic yeasts against postharvest pathogens of pear. **International Journal of Food Microbiology**, v. 164, n. 2–3, p. 166–172, 2013.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Embrapa Milho e Sorgo. 1995. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/490408/1/Circ76.pdf>>. Acesso em: 26 Fevereiro 2018.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M.; PAIVA, E. **Fisiologia da planta de milho**. Embrapa Milho e Sorgo. 1995. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/475778>>. Acesso em: 26 Fevereiro 2018.

MANFROI, E. et al. Chemical control of foliar diseases and grain yield in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 357–365, 2016.

MANFROI, E. et al. Controle químico de doenças foliares e rendimento de grãos na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 15, n. 2, p. 357–365, 2016.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Política Agrícola. **Projeção do Agronegócio - Brasil 2016/2017 a 2026/2017**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/todas-publicacoes-de-politica-agricola/projecoes-do-agronegocio>>. Acesso em: 08 de Março 2018.

MENTEN, J. O. **Agrotóxicos: benefícios, riscos e cuidados**. ANDEF, 2016. Disponível em: <<http://www.andef.com.br/imprensa/artigos/1810-agrotoxicos-beneficios-riscos-e-cuidados>>. Acesso em: 10 fevereiro 2018.

MERCIER, J.; LINDOW, S. E. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 369–374, 2000.

MICHELOTTO, M. D. et al. Efficacy of transgenic mayze insecticide treatment to control fall armyworm in late-season maize in São Paulo state, Brazil. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 41, n. 2, p. 128–138, 2017.

MICHEREFF, S. J.; BARROS, R. **Proteção de Plantas na Agricultura Sustentável**. 1º Edição. UFRPE, 2001.

MORANDI, M. A. B. et al. Controle biológico de pragas e doenças. **Informe Agropecuário**. v. 30, p. 73–82, 2009.

MUCCILLI, S.; RESTUCCIA, C. Bioprotective Role of Yeasts. **Microorganisms**, v. 3, n. 4, p. 588–611, 2015.

MUCHOVEJ, J. J.; MUCHOVEJ, R. M. C.; RIBEIRO, N. M. L. Taxonomia de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 3, p. 211–223, 1988.

NETO, D. D. et al. Corn Morphology and Yield Aspects Affected By Herbicides in Two Application Timmings. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**, v. 10, n. 1, p. 82–94, 2003.

NWANOSIKE, M. R. O.; MABAGALA, R. B. Assessment of Maize (*Zea mays* L.) *Exserohilum Turcicum* (Pass.) Leonard and Sugg. Isolates on Different Culture Media in Tanzania. **World Journal of Agricultural Research**, v. 5, n. 6, p. 292–298, 2017.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão de milho. **EMBRAPA**. Circular Técnica 75, v. 75, p. 6, 2006.

PASCHOLATI, S. F. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. Em: Liliam Amorim, Jorge Alberto Maerques Rezende e Armando Bergamin Filho. **Manual de Fitopatologia:**

Princípios e conceitos. Vol. 1. Ceres, São Paulo, Brasil, 2011, v.1, p. 593-635.

PELCZAR, M.S.; REID, R.D.; CHAN, E.C.S. **Microbiologia.** São Paulo; McGraw-Hill do Brasil, v.1, 1981.

PASSARDI, F. et al. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. **Plant Cell Reports**, v. 24, n. 5, p. 255–265, 2005.

PAVÃO A. R.; FILHO J. B. S. F. Impactos econômicos da introdução do milho Bt11 no Brasil: uma abordagem de equilíbrio geral inter-regional. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 49 n.1, 2011.

PEÑUELAS, J. et al. Summer season and long-term drought increase the richness of bacteria and fungi in the foliar phyllosphere of *Quercus ilex* in a mixed Mediterranean forest. **Plant Biology**, v. 14, n. 4, p. 565–575, 2012.

PEREIRA, A. A. **Oomicetos (Oomycota) no Campo Agrícola de Nazária, Piauí – Sustentabilidade na Prevenção e Controle dos Fitopatógenos em Agricultura Familiar.** 2008. Dissertação (Mestrado Desenvolvimento e Meio Ambiente). Universidade Federal Do Piauí, Teresina, 2008.

PEREZ, M. F. et al. Antagonistic yeasts for the biological control of *Penicillium digitatum* on lemons stored under export conditions. **Biological Control**, v. 115, October, p. 135–140, 2017.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 5–9, 2005.

PINTO, N. F. J. A. Controle químico de doenças foliares em milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 01, 2010.

PINTO, N. F. J. A. Chemical Control of Foliar Diseases in Corn. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**. v. 3, n. 1, p. 134–138, 2004.

PONSONE, M. L. et al. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section Nigri in grapes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 151, n. 1, p. 70–77, 2011.

RIMA, H.; STEVE, L.; ISMAIL, F. Antimicrobial and probiotic properties of yeast: from fundamental to novel applications. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. 421, 2012.

RIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças de milho**. Lavras: Ciências Agrotécnicas, p. 331. 2004.

RONCATTO, M. C.; PASCHOLATI, S. F. Alterações na atividade e no perfil eletroforético da peroxidase em folhas de milho (*Zea mays*) e sorgo (*Sorghum bicolor*) tratadas com levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, v. 55, n. 3, p. 395–402, 1998.

ROSSI, R. L.; REIS, E. M.; BRUSTOLIN, R. Conidial morphology and pathogenicity of *Exserohilum turcicum* isolates of corn from Argentina and Brazil. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 1, p. 58-63, 2015.

ROSSI, R. L. REIS, E. M.; BRUSTOLIN, R. Morfologia de conídios e patogenicidade de isolados de *Exserohilum turcicum* da Argentina e do Brasil em milho. **Summa Phytopathologica**, n. 13, p. 58–63, 2015.

SANTOS, G.R.; FILHO, A.C.C.; REIS, A. Resistência de *Didymella bryoniae* a Fungicidas no Brasil. **Fitopatologia Brasileira**. v. 31, p. 476-482. 2006.

SARTORI, M. et al. Efficacy of epiphytic bacteria to prevent northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum* in maize. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 1, p. 75–82, 2017.

SARTORI, M. et al. Selection of potential biological control of *Exserohilum turcicum* with epiphytic microorganisms from maize. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 1, p. 62–71, 2015.

SHETTY, N. P.; LYNGS, H. J. J.; JESNSEN, J. D.; COLLINGER, D. B.; SHETTY, S. Roles of reactive oxygen species in international between plants and pathogens. **European Journal of Plant Pathology**, v. 121, p. 265-280, 2008.

SILVA, A. F. M. DA. Andre Moreira Consumo de agrotóxicos, 2016.

SILVA, J. C. E. et al. The Efficiency of Noni (*Morinda citrifolia* L.) Essential Oil on the Control of Leaf Spot Caused by *Exserohilum turcicum* in Maize Culture. **Medicines**. v. 60, n. 4, p. 1–10, 2017.

STADNIK, M. J.; BUCHENAUER, H. Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 57, n. 1, p. 25–34, 2000.

STANGARLIN, J. R. et al. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18–46, 2011.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Proteção de plântulas de milho pipoca contra *Exserohilum turcicum* pelo uso de *Saccharomyces cerevisiae*. **Summa Phytopathologica**. v. 20, p. 16-21. 1994.

STROMBERG, K. D.; KINKEL, L. L.; LEONARD, K. J. Quantifying the effect of bacterial antagonists on the relationship between phyllosphere population sizes of *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* and subsequent bacterial leaf streak severity on wheat seedlings. **Biological Control**, v. 29, n. 1, p. 58–65, 2004.

TAIZ, L.; ZEIGER, F. **Fisiologia Vegetal**. Porto Alegre: ARTMED, p. 719, 2004.

TAKIKAWA, Y. et al. Conidia of *Erysiphe trifoliorum* attempt penetration twice during a two-step germination process on non-host barley leaves and an artificial hydrophobic surface. **Mycoscience**, v. 52, n. 3, p. 204–209, 2011.

TSUDA, K. et al. Biological control of bacterial soft rot in Chinese cabbage by *Lactobacillus plantarum* strain BY under field conditions. **Biological Control**, v. 100, p. 63–69, 2016.

USDA, Uitede States Departamnt of Agriculture. Agricultural Marketing Service Farm Service Agency. **World Agricultural Supply and Demand Estimates**. 2018. Disponível em: <<https://www.usda.gov/oce/commodity/wasde/>>. Acesso em: 01 de março 2018.

USDA. **Census of agriculture, farmers by age** [online]. Disponível em:

<www.agcensus.usda.gov/Publications/2007/Online_Highlights/Fact_Sheets/Demographics/farmer_age.pdf>. Acesso em: 26 maio de 2016.

WANG, H. et al. The inhibitory activity of endophytic *Bacillus sp.* strain CHM1 against plant pathogenic fungi and its plant growth-promoting effect. **Crop Protection**, v. 28, n. 8, p. 634–639, 2009.

WILSON, M.; HIRANO, S. S.; LINDOW, S. E. Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 1435–1443, 1999.

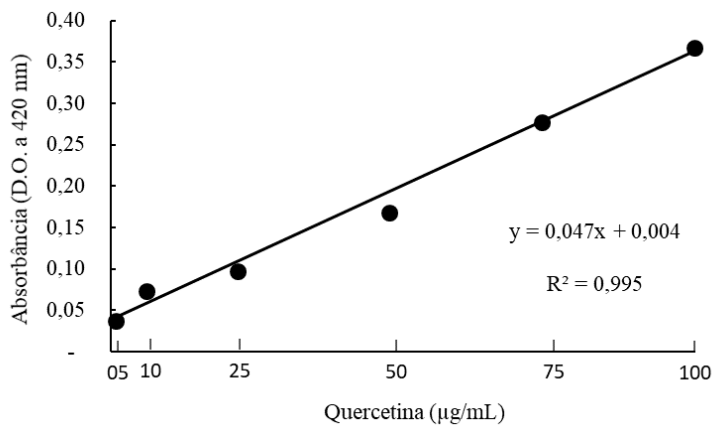
ZANARDO, N. M. T.; PASCHOLATI, S. F.; FIALHO, M. B. Resistência de plântulas de pepineiro a *Colletotrichum lagenarium* induzida por frações de extrato de *Saccharomyces cerevisiae*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 11, p. 1499–1503, 2009.

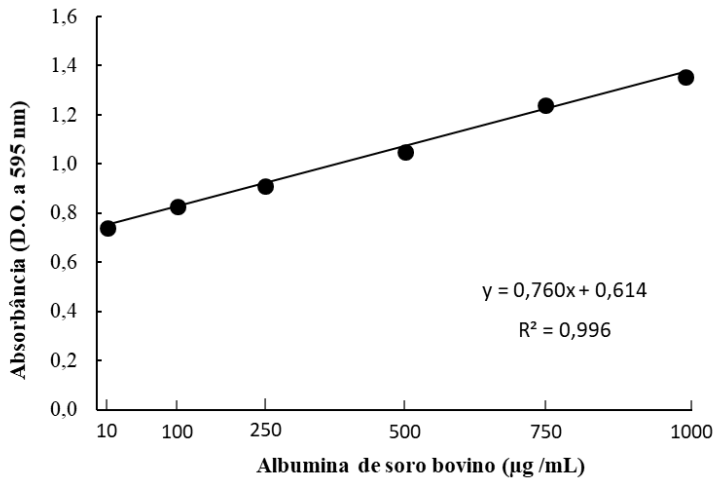
ZANATTA, P. **Controle preventivo de doenças foliares em híbridos comerciais de milho com fungicidas em espaçamento Reduzido**. 2013. 64 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, Irati, 2013.

ZHANG, X. D.; ZHANG, H. Y.; PING, S. Biological control of postharvest green mold decay of oranges by *Rhodotorula glutinis*. **European Food Research and Technology**, v. 220, p. 353–357, 2005.

ANEXO

ANEXO A – Curva padrão para dosagem do conteúdo de flavonoides.



ANEXO B – Curva padrão para dosagem de proteínas totais.

ANEXO C – Curva padrão para dosagem de fenilalanina amônia liase.

