

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

DAVID FERNANDO POSSO SUÁREZ

Produtos naturais fermentados: Ativação de mecanismos de defesa e controle de
cercosporiose em milho pipoca

Maringá
2017

DAVID FERNANDO POSSO SUÁREZ

Produtos naturais fermentados: Ativação de mecanismos de defesa e controle de cercosporiose em milho pipoca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Área de concentração: Proteção de Plantas

Orientador: Prof^a. Dr^a. Kátia Regina

Freitas Schwan-Estrada

Maringá
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

P856p	Posso Suárez, David Fernando Produtos naturais fermentados : ativação de mecanismos de defesa e controle de cercosporiose em milho pipoca / David Fernando Posso Suárez. -- Maringá, 2017. xiii, 75 f. : il. color., figs., tabs. Orientadora: Prof.^a Dr.^a Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2017. 1. Milho-pipoca (Zea mays L.) - Controle alternativo. 2. Milho-pipoca (Zea mays L.) - Resistência induzida. 3. Indutores de resistência. 4. Atividade enzimática. 5. Cercosporiose. 6. Severidade. I. Schwan-Estrada, Kátia Regina Freitas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Agronomia. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. III. Título. CDD 23.ed. 633.15 GVS-003731
-------	--

FOLHA DE APROVAÇÃO

DAVID FERNANDO POSSO SUÁREZ

PRODUTOS NATURAIS FERMENTADOS: ATIVAÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA E CONTROLE DE CERCOSPORIOSE EM MILHO PIPOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia do Departamento de Agronomia, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia pela Banca Examinadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada
Universidade Estadual de Maringá –UEM

Prof. Dra. Solange Maria Bonaldo
Universidade Federal do Mato Grosso – UFMT/Sinop

Prof. Dra. Edilaine Maurícia Gelinski Grabicoski
Universidade Estadual de Maringá -UEM

Aprovada em: de fevereiro 24 de 2017.

Local da defesa: Sala 16, Bloco J45, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

*Dedico todos meus esforços
e minha dissertação com
todo o carinho em memória
de minha querida amiga
Julieth Andrea Rojas,
QUE EM PAZ DESCANSE,
obrigado por tua amizade.*

AGRADECIMENTOS

Para atingir o título de Mestre em Agronomia, não só foi necessário meu esforço pessoal, o acompanhamento e apoio de pessoas que contribuíram a minha formação foi muito importante e essencial para conseguir finalizar meus estudos com sucesso.

Assim, quero agradecer primeiramente a Deus por seu amor absoluto e por permitir-me a oportunidade de acrescentar meus conhecimentos e crescer como pessoa.

A meus pais Blanca Suárez e Christian Alberto Posso, meu irmão Christian Manuel Posso, minha sobrinha Maria José Posso e minha cunhada Ana Maria Lemos, obrigado por seu amor e apoio incondicional.

A minha namorada Nataly Arango por sua compreensão e amor.

Muito obrigado às pessoas que me acompanharam na realização desta experiência:

Professora Kátia Regina Freitas Schwan-Estrada por seu carinho, amizade e sua orientação para a realização desta pesquisa.

Professor Dauri José Tessmann, por sua co-orientação e por compartilhar comigo seus conhecimentos na área da fitopatologia.

Ao Coordenador do PGA: Professor Antônio Carlos Saraiva Da Costa

À secretaria do PGA: senhora Erika Cristina Takamizawa Sato, obrigado por sua ajuda.

Ao senhor Leonel Estrada por sua amizade e suas boas ideias para minha pesquisa.

Os meus colegas e amig@s de laboratório: Antônio Jussie Solino, Virleene Amaral, Larisse Oliva, Juao Batista, Janaina Simon, Lorrana Lopes, Thaisa Mioranza, Larissa Zubek, Mariana Saab, Camila Rocco, Monica Mizuno, Geovanna, Jéssica Brasau e Juliana Oliveira.

Ao Laboratorista Paulo Sérgio Castanho, pela amizade e pelo apoio técnico na tomada de decisões.

A Lorrant Cavanha e Calorilna Bertuzzi pela ajuda na execução dos experimentos.

Os meus melhores amigos de PGA: Arleneo Machado, Lorrant Cavanha e Lucas Caiubi.

Os meus melhores amigos de Maringá: Yessica Acosta, Jesus Encinas, Luis Araujo, Rodrigo Lima e Michel Isidro.

À empresa Microgeo® pela gestão do produto para realização das diferentes avaliações

À Universidade Estadual de Maringá, pela oportunidade de permitirme formar-me como Mestre em Agronomia.

À Organização dos Estados Americanos – OEA e ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras – GCUB, pela gestão para eu poder estudar neste maravilhoso país.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo apoio financeiro.

Produtos naturais fermentados: Ativação de mecanismos de defesa e controle de cercosporiose em milho pipoca

RESUMO

A indução de resistência (IR) em plantas por produtos naturais tem sido o objeto de vários estudos, sendo estas ativadas por moléculas elicitoras de origem biótica ou abiótica. Os elicitores ativam mecanismos de resistência como as Proteínas Relacionadas a Patogêneses (PRP's) e as fitoalexinas, que atuam na proteção de plantas impedindo o desenvolvimento do patógeno. O presente trabalho teve como objetivo verificar a ativação de PRP's (peroxidase, catalase, polifenoloxidase e β - glucanases) em plantas de milho pipoca e da fitoalexina gliceolina, em plantas de soja tratadas com diferentes concentrações do produto comercial Microgeo[®] e um Biofomulado elaborado com capim limão fermentado. Analisando as enzimas PRP's, observou-se que Microgeo[®] ativou e incrementou a atividade destas enzimas e que esta indução esta mais relacionada ao tempo de ativação, mas não à dosagem utilizada. O Microgeo[®] também é capaz de induzir o acúmulo de gliceolinas em plantas de soja. Por outro lado observou-se que o Bioformulado também ativa e incrementa a atividade destas enzimas, e que este acúmulo está relacionado ao tempo de ativação, mas não à dosagem utilizada, porém o Bioformulado não induz acúmulo de gliceolinas em plantas de soja. A aplicação de Microgeo[®] e Bioformulado não apresentam eficiência significativa no controle da severidade de Cercosporiose em plantas de milho pipoca.

Palavras-chave: Controle alternativo, Resistencia induzida, indutores, atividade enzimática, Cercosporiose, severidade.

Natural fermented products: Activation of defense mechanisms and control of cercosporiose in popcorn

ABSTRACT

Resistance induction (IR) in plants by natural products has been the object of several studies, being activated by elicitor molecules of biotic or abiotic origin. Elicitors activate resistance mechanisms such as Pathogen-Related Proteins (PRPs) and phytoalexins, which act to protect plants from the development of the pathogen. The present work aimed to verify the activation of PRP (peroxidase, catalase, polyphenoloxidase and β -glucanases) in popcorn plants and phytoalexin in soybean and bean plants treated with different concentrations of the commercial product Microgeo[®] and a Bioformulate made with lemon grass fermented. Analyzing the PRP's enzymes, it was observed that Microgeo[®] activated the increase of an enzymatic activity and that this induction is more pertinent to the period of application than the dosage used. Microgeo[®] is also capable of inducing the accumulation of glyceolin in soybean plants. On the other hand, it was observed that the Bioformulate also activates and increases the activity of these enzymes, and that this accumulation is related to the period of application, but not to the dosage used, however the Bioformulate does not induce accumulation of glyceolin in soybean plants. The application of Microgeo[®] não presents a efficiency significant in controlling the Cercosporiose in popcorn plants.

Keywords: Controle alternativo, Resistencia induzida, indutores, atividade enzimática, Cercosporiose, severidade.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores de pH dos fermentados aplicados na cultura do milho pipoca, no momento da aplicação	24
Tabela2. Atividade específica de catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo [®]	38
Tabela 3. Atividade específica de peroxidase de guaiacol ($\text{ABS min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo [®]	40
Tabela 4. Atividade específica de polifenoloxidase ($\text{Unit.min}^{-1}.\text{mg}^{-1}.\text{proteína}$) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo [®]	42
Tabela 5. Atividade específica de β 1,3-glucanase ($\text{mg glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo [®]	44
Tabela 6. Atividade específica de catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.	46
Tabela 7. Atividade específica de peroxidase ($\text{ABS min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.	48
Tabela 8. Atividade específica de polifenoloxidase ($\text{Unit min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.....	50
Tabela 9. Atividade específica de β 1,3-glucanase ($\text{mg glicose min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários	

de coletas dentro das concentrações de Bioformulado	52
Tabela 10. Taxa de progresso da Cercosporiose em plantas de milho pipoca com os diferentes tratamentos	57
Tabela 11. Severidade média, Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de Cercosporiose em milho pipoca e porcentagem de controle em relação às plantas só inoculadas	58
Tabela 12. Biometria (altura, diâmetro do colmo, massa fresca, massa seca, clorofila <i>a</i> , clorofila <i>b</i> , clorofila total, 60 dias após a semeadura de plantas de milho pipoca	59

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Semeadura do milho pipoca. A- Peneiramento do solo e mistura com areia. B- Vasos de três L com o substrato. C- Sementes de milho pipoca, variedade Pará. D- Plantio 23
- Figura 2.** Aplicação dos tratamentos. A- Dosagem de Microgeo[®] e do bioformulado. B- Borrifadores para cada tratamento. C- Rotulagem das plantas. D- Aplicação folhar dos tratamentos..... 24
- Figura 3.** Coleta das amostras. A- Coleta de folhas destacadas. B/C- Armazenamento da folha em papel alumínio. D- Armazenamento em gelo. E- Pesagem das amostras. 25
- Figura 4.** Preparação do extrato enzimático. A- Folha em N₂ líquido. B- Folha macerada com poli vinil fosfato. C- Homogeneização com 4mL de tampão fosfato. D- Transferência a tubos de microcentrífuga de 2mL. E- Armazenagem em gelo do extrato enzimático. 26
- Figura 5.** A- Centrifugação do extrato enzimático. B- Sobrenadante e precipitado. C- Obtenção do sobrenadante 26
- Figura 6.** Multiplicação dos isolados de *Cercospora zeae-maydis* em meio V8 30
- Figura 7.** Inoculação dos grãos de sorgo com *Cercospora zeae-maydis*. A- Erlenmeyers de 125 mL em adição com 20 gramas de grãos de sorgo, previamente umedecidos com 16 mL de água destilada e autoclavados. B- Placas com discos do meio V8 colonizados por *C. zeae-maydis*, C- Erlenmeyer de 125 mL com os grãos de sorgo e discos colonizados por *C. zeae-maydis*..... 31
- Figura 8.** Estágios fenológicos do milho..... 32
- Figura 9.** Inoculação de plantas de milho com *Cercospora zeae-maydis*. A- Erlenmeyers de 125 mL com grãos de sorgo inoculados com o fungo. B- Detalhe dos grãos inoculados. C- Depósito dos grãos de sorgo no cartucho. D- 15 grãos de sorgo no cartucho da planta. E- Plantas inoculadas em câmara úmida..... 32

- Figura 10.** Escala diagramática da *Cercospora zeae-maydis*: A) folhas com entre 0 e 1% de lesões cloróticas; B) folhas com entre 1 e 5% de lesões cloróticas; C) folhas com entre 5 e 10% de lesões cloróticas; D) folhas com entre 10 e 15% de lesões cloróticas; E) folhas com entre 15 e 20 % de lesões cloróticas; F) folhas com entre 20 e 25% de lesões cloróticas; G) folhas com entre 25 e 30% de lesões cloróticas 34
- Figura 11.** Amostras para clorofila *a* e *b* de plantas de milho. A e B- Retirada de discos foliares de 10 mm. C- Pesagem dos discos foliares. D- Depósito dos discos foliares em frascos âmbar com 5 mL de acetona 35
- Figura 12.** Atividade específica de catalase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=3,45%..... 38
- Figura 13.** Atividade específica de peroxidase de guaiacol em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=7%..... 40
- Figura 14.** Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=7%..... 42
- Figura 15.** Atividade específica de β 1,3-glucanase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=7%..... 44
- Figura 16.** Atividade específica de catalase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120h (E);

CV=1,20%.....	46
Figura 17. Atividade específica de peroxidase de guaiacolem plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120h (E); CV =6,12%.....	48
Figura 18. Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120h (E); CV=8,66%.....	50
Figura 19. Atividade específica de β 1,3-glucanase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120h (E); CV=4,36%.....	52
Figura 20. Acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja BRS 184 tratados com Microgeo®	55
Figura 21. Lesões iniciais de Cercosporiose. A- Lesões paralelas à nervura. B- Lesão vista ao microscópio (10X).	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1	Cultura do milho (<i>Zea mays L</i>)	4
2.2	Milho pipoca (<i>Zea mays everta</i>)	5
2.3	Doenças na cultura de milho pipoca.....	6
2.3.1	A cercosporiose do milho (<i>Cercospora zeae-maydis</i>).....	7
2.4	Quantificação de doenças	9
2.5	Avaliação da cercosporiose do milho	10
2.6	Indução de resistência em plantas	11
2.6.1	Resistência verdadeira	13
2.6.2	Resistência aparente	14
2.6.3	Indutores de resistência	14
2.7	Proteínas relacionadas à patogênese (PRP's)	15
2.7.1	Atividade de peroxidase	16
2.7.2	Atividade de catalase.....	17
2.7.3	Atividade de polifenoloxidase	18
2.7.4	Atividade de β -1,3 glucanase.....	19
2.7.5	Fitoalexinas.....	19
2.7.6	Clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Experimento 1: Produtos naturais fermentados: ativação de mecanismos de defesa em milho pipoca.....	22
3.1.2	Indutores de resistência	22
3.1.3	Semeadura do milho pipoca	23
3.1.4	Aplicação dos tratamentos	23
3.1.5	Coleta das amostras	24
3.1.6	Preparo do extrato enzimático	25
3.2	Análises enzimática	26
3.2.1	Proteínas totais	27
3.2.2	Atividade de peroxidase de guaiacol.....	27
3.2.3	Atividade de catalase.....	27

3.2.4 Atividade de polifenoloxidase	28
3.2.5 Atividade de β 1,3 glucanase	28
3.2.6 Produção de gliceolinas em soja	29
3.3 Delineamento experimental e análise de dados	29
3.4 Experimento 2: Produtos naturais fermentados: controle de Cercosporiose (<i>Cercospora zeae-maydis</i>) em plantas de milho pipoca tratadas com Microgeo® e Bioformulado a base de capim limão	30
3.4.1 Obtenção e preparo do inóculo	30
3.4.2 Multiplicação do inóculo de <i>Cercospora zeae-maydis</i> em grãos de sorgo.....	30
3.4.3 Inoculação das plantas de milho pipoca com <i>Cercospora zeae-maydis</i>	31
3.4.4 Aplicação dos tratamentos.....	33
3.4.5 Avaliação da severidade de Cercosporiose	33
3.4.6 Teor de clorofila <i>a</i> , <i>b</i> e total.....	34
3.4.7 Biometria	35
3.5 Delineamento experimental e análise de dados	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 Experimento 1: Produtos naturais fermentados: ativação de mecanismos de defesa em milho pipoca	37
4.1.1 Ativação de PRP's mediante a aplicação de Microgeo® nas diferentes concentrações e tempos de coleta	37
4.1.2 Catalase.....	37
4.1.3 Peroxidase de guaiacol	39
4.1.4 Polifenoloxidase.....	41
4.1.5 β 1,3-glucanase	43
4.2 Ativação das PRP's mediante a aplicação de Bioformulado nas diferentes concentrações e tempos de coleta	45
4.2.1 Catalase.....	45
4.2.2 Peroxidase.....	47
4.2.3 Polifenoloxidase.....	49
4.2.4 β 1,3-glucanase	51
4.2.5 Produção de gliceolinas em soja	54
4.3 Experimento 2: Produtos naturais fermentados: controle de Cercosporiose (<i>Cercospora zeae-maydis</i>) em plantas de milho pipoca tratadas com Microgeo® e	

	Bioformulado a base de capim limão	55
5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICES	75
	Apêndice A – Curva padrão de albumina com soro bovino.....	75
	Apêndice B – Curva padrão para glicose	75

1 INTRODUÇÃO

Os cereais são produzidos em todo o mundo por conterem grande quantidade de carboidratos, constituindo, desta forma, a principal fonte de energia ingerida pelos seres humanos. Estas culturas apresentam em média entre 12 a 13% de água, 9 a 13% de proteína, 2 a 5% de lipídios, 0,5 a 2% de fibras e de 1 a 1,3 de minerais (EMBRAPA, 2015).

No Brasil, a estimativa da produção de grãos para a safra 2016/2017 foi de 219,14 milhões de toneladas e uma área plantada de 59,54 milhões de hectares (CONAB, 2017).

Dentre os cereais a cultura do milho (*Zea mays* L.) se caracteriza pelas grandes extensões de terra semeada no mundo, bem como pelo grande número de empregos diretos e indiretos que gera (JEGLAY, 2006). De acordo com USDA (2016), a produção mundial de milho atingida foi de 974,9 milhões de toneladas para a safra 2015/2016.

O milho tem um importante papel socioeconômico no Brasil, colocando-se em posição de relevância no que se refere a valor da produção agropecuária, área plantada e volume produzido (ALVES et al, 2015; FANCELLI e DOURADO NETO, 2001). A produção de milho para o período de 2016/2017 para a primeira e segunda safra foi de 28,82 milhões de toneladas e de 58,59 milhões de toneladas respectivamente, de maneira que o estado de Mato Grosso foi o maior produtor com uma produção de 23,3 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

De modo geral, a cultura de milho é afetada pela presença de pragas e doenças, que são controladas principalmente mediante o uso indiscriminado de pesticidas, atividade que ao longo do tempo, pode resultar em contaminação do meio ambiente e da população, além da seleção de raças resistentes de patógenos às moléculas sintéticas disponíveis no mercado (GHINI et al., 2000). Além disso, diferentes fatores contribuem para o aumento das doenças na cultura de milho, como por exemplo, o aumento de inóculo proporcionado pela prática do plantio direto, pela sucessão de cultivos e pela manutenção da umidade por irrigações via pivô central (SILVA, 1997). Outro fator que influencia no incremento da intensidade de doenças relaciona-se aos programas de melhoramento, que concentram seus esforços principalmente na obtenção de híbridos mais produtivos, diminuindo a importância do controle genético sobre os patógenos da cultura (BARROS, 2011).

Por exemplo, doenças causadas por fungos podem comprometer o potencial de rendimento da cultura (WHITE, 1999). De acordo com a Embrapa Milho e Sorgo (2006), a cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis* Tehon e Daniels e *Cercospora sorghi* Ellis e Everth),

a mancha branca (*Phaeosphaeria maydis* Henn), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora* Schwein), a ferrugem tropical (*Physopella zae* Cummins e Ramachar), a helmintosporiose (*Ezserohilum turcicum* Leonard e Suggs e *Bipolaris maydis* Y. Nisik e C. Miyake) e os enfazamentos pálido e vermelho (*Spiroplasma kunkelii* Delong e Wolcott) estão entre as principais doenças da cultura do milho. Estes problemas fitossanitários aumentam a utilização de fungicidas, principalmente pela falta de rotação de culturas em localidades com clima favorável à produção deste cereal, onde são cultivadas até cinco safras a cada dois anos, (entre cultivos de verão e safrinha), fato que favorece o aumento de inóculo de diferentes patógenos e em consequência, a severidade de doenças, dentre elas a cercosporiose (BARROS, 2011).

Em diferentes países como Estados Unidos e a África do Sul, a cercosporiose ou mancha de cercospora, causada pelo fungo *Cercospora zae-maydis*, é uma das principais enfermidades da cultura do milho, que pode causar perdas entre 25 e 65%; contudo no Brasil especificamente, estima-se que as perdas por essa doença sejam iguais naqueles países (MATHIONI, 2006). De acordo com Pinto et al. (2004), esta enfermidade é controlada principalmente com a aplicação de produtos químicos como mancozeb, propiconazole e chlorothalonil. Contudo Embrapa Milho e Sorgo (2009) reportam como outras medidas para reduzir o potencial de inóculo como são o estabelecimento de plantio em época adequada, a utilização de sementes de boa qualidade e tratadas com fungicidas, a rotação de culturas, o fornecimento de uma adubação equilibrada na cultura e como principal medida o emprego de cultivares resistentes,

Uma alternativa para o controle de doenças na cultura de milho é a indução de resistência, processo no qual se ativam diferentes respostas e rotas metabólicas que se organizam em tempo e espaço por toda a planta para o combate de patógenos. Pascholati e Leite (1995) e Smith (1996), reportaram que a indução de resistência é a ativação dos sistemas de defesa da planta, quando elas entram em contato com os elicitores, por meio da percepção e transdução de sinais biológicos a nível celular (HAHN, 1999; ANGELOVA et al., 2006). De modo geral as substâncias elicitoras podem ser de origem biótica, como organismos viáveis ou componentes de suas estruturas, ou de tipo abiótica, como ácido salicílico, luz ultravioleta, fosfitos, silicatos, alguns metais pesados entre outros. Contudo, os indutores de resistência não atuam do mesmo modo que os agroquímicos convencionais, pois apresentam baixa toxicidade ao organismo alvo e ativam mecanismos de defesa latentes nas plantas (COLARES e BONALDO, 2014). Por isto a possibilidade de ativação dos genes, mediante o emprego de indutores de resistência em plantas é uma alternativa de baixo

impacto ambiental, comercialmente viável e atrativo para os agricultores (PETEIRA, 2008); ademais a demanda por insumos menos tóxicos justifica a busca por produtos alternativos visando o controle de doenças de plantas na agricultura. Sendo o Brasil o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (MMA, 2014), o emprego de indutores para a ativação dos mecanismos de resistência em diferentes culturas é uma estratégia sustentável e com alto potencial no controle de doenças, que pode ser adotada na cultura do milho.

A hipótese estabelecida neste estudo considera que plantas de milho pipoca tratadas com o adubo orgânico Microgeo[®] e o Bioformulado elaborado com capim limão fermentado, ativam os mecanismos de resistência em plantas de milho pipoca. Visto que ambos os produtos ainda não foram testados como indutores de mecanismos de resistência de plantas de milho pipoca, objetiva-se: 1) verificar a produção de fitoalexinas e a indução das proteínas relacionadas à patogêneses, peroxidases, catalase, β -1,3 glucanase e polifenoloxidase, em plantas de milho pipoca tratadas com diferentes concentrações desses produtos e 2) avaliar em casa de vegetação, a severidade de Cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*) em plantas de milho pipoca tratadas com Microgeo[®] e Bioformulado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cultura do milho (*Zea mays* L)

O milho é uma espécie monocotiledônea, monóica, alógama, pertencente à família Poaceae, Subfamília Panicoidae, que possui um ciclo entre quatro a cinco meses (NOGUEIRA, 2015). De acordo com Acosta (2009) o milho originou-se na Guatemala e no México entre os anos 8000 e 600 a.C, provavelmente a 500 km da Cidade do México. As mais antigas civilizações das Américas desde os povos Olmecas e Teotihuacanos na Mesoamérica, até os Incas e Quéchuas na região andina da América do Sul, tiveram seu desenvolvimento marcado por esta planta (SERRATOS, 2009). Segundo Embrapa (2008), desde a chegada dos portugueses há mais de 500 anos, o consumo deste cereal e de produtos a base de milho aumentou entre os brasileiros. No entanto, sabe-se que este cereal era cultivado pelos índios, principalmente pelos índios guaranis que tinham o milho como o principal ingrediente de sua dieta.

A cultura do milho é uma das principais culturas cultivadas no mundo, da que se obtêm produtos para humanos e animais, além de matérias primas essenciais para a indústria (SEVERINO, 2006). De acordo com USDA (2016), a produção mundial de milho atingida foi de 974,9 milhões de toneladas para a safra 2015/2016.

De acordo com Conab (2017), no Brasil a cultura do milho para o período de 2016/2017, a estimativa de produção para a primeira e segunda safra foi de 28,82 milhões de toneladas e de 58,59 milhões de toneladas respectivamente, de maneira que o estado de Mato Grosso foi o maior produtor com uma produção de 23,3 milhões de toneladas (CONAB, 2017).

Segundo Fancelli e Dourado-Neto (2003), diferentes fatores como a fertilidade do solo, disponibilidade hídrica, sistema de cultivo, potencial produtivo do híbrido e manejo de plantas daninhas, pragas e doenças influenciam no rendimento da cultura do milho.

2.2 Milho pipoca (*Zea mays everta*)

De acordo com Gama et al. (1990), uma das teorias sobre a origem do milho pipoca (*Zea myas everta*) é que seja originário do Teozinte (*Zea mexicana*) por seleção do homem. No entanto, se por um lado Freire (2015) indica que essa semente apareceu como uma mutação do milho “Flint”, por outro lado autores como Zinsly e Machado (1987) argumentam que o milho pipoca está entre os mais antigos milhos encontrados.

Zinsly e Machado (1987) afirmaram que devido à descoberta de sementes de milho juntas a utensílios de barro em algumas tumbas pré-históricas no Peru, o milho mais antigo é o milho pipoca, fato reforçado pela descoberta de milho tipo pipoca em Bat Cave (Novo México, em 2500 a.C.), comparado com o milho comum tipo dentado cujas primeiras descrições datam de 1700 a.C., nos Estados Unidos. Diferentes teorias têm sido propostas acerca da origem e evolução do milho pipoca, mas nenhuma delas pode ser aceita como definitiva.

O milho pipoca, *Zea mays everta*, pertencente à família Poaceae, subfamília Panicoideae e tribo Maydeae e se diferencia do milho comum, pois possui uma fina cápsula que envolve o endosperma do grão (DALBELLO et al., 1995). Comparativamente ao milho comum, as plantas de milho pipoca caracterizam-se por serem mais frágeis, menores, com colmo mais fino, com menor número de folhas, maior produção de descendentes e maiores suscetibilidades às pragas e doenças (CARPENTIERI-PIPOLO et al., 2002). No entanto, Linares (1987) aponta que as plantas de milho pipoca com respeito ao milho comum, possuem maior pendão, espigas menores inseridas a maior altura e colmos mais finos. Galvão et al. (2015); adicionalmente, reportam que o milho pipoca caracteriza-se por sua produtividade, resistência ao acamamento das plantas, resistência às doenças e pragas e pela qualidade dos grãos, que é avaliada pela capacidade de expansão, cor do grão, maciez, sabor, aroma e cor da “flor” da pipoca.

Contudo, o milho pipoca diferencia-se de outros milhos pelas sementes menores e mais duras com quantidade maior de endosperma duro no grão e pericarpo mais espesso, sendo que existem dois tipos de grãos: o grão tipo “arroz”, mais longo e fino e o tipo “perolado”, com grãos mais arredondados (MIOTTO, 2013). O milho pipoca ainda diferencia-se dos demais tipos de milhos, devido a sua “característica de expansão”, a qual é explicada pela resistência do pericarpo, associada à presença de óleo e de umidade do grão, que quando aquecido em temperatura apropriada exercem forte pressão sobre o pericarpo,

cujo rompimento expõe o endosperma (FANCHIN et al., 1993). No mundo, o milho pipoca, caracteriza-se como um aperitivo com grande sucesso na indústria do entretenimento geralmente associado ao consumo de pipocas em cinemas, shows ou em parques (FREIRE, 2015).

Segundo Galvão et al (2015), o maiores produtores a nível mundial de milho pipoca são os Estados Unidos e como segundo maior produtor figura o Brasil; já no Brasil, os maiores produtores de milho pipoca de acordo com o IBGE (2014), são os municípios de Campo Novo do Parecis em Mato Grosso e Nova Prata em Rio Grande do Sul. De acordo com Junior et al. (2006), o incremento do uso de fornos micro-ondas para a expansão do milho pipoca, deu lugar a um aumento na produção e consumo nacional de milho pipoca, produto agrícola considerado de alto valor económico e de elevada rentabilidade para os produtores (SILVA et al., 2009).

O cultivo de milho pipoca é considerado de elevada rentabilidade, cujo produto final possui grande aceitação ativando a economia informal (RANGEL et al., 2011). No entanto, existem limitações como são a escassez de genótipos resistentes às doenças fúngicas (SCAPIM et al., 2002), e a época de semeadura é limitada, basicamente, pelas condições de temperatura e pela distribuição de chuvas (VAZ-DE-MELO et al., 2012). No Brasil, a produção de milhos especiais apresenta um incremento para os produtores, entre eles destacam-se o milho doce e o milho pipoca, que tem preços diferenciados com respeito ao milho comum (SOUZA et al., 2014).

2.3 Doenças na cultura do milho pipoca

As doenças do milho limitam a produção da cultura; de acordo com a Embrapa Milho e Sorgo (2006) e Lima (2012), a cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis* Tehon e Daniels e *Cercospora sorghi* Ellis e Everth), a mancha branca (*Phaeosphaeria maydis* Henn), a ferrugem polissora (*Puccinia polysora* Schwein), a ferrugem tropical (*Physopella zeae* Cummins e Ramachar), a helmintosporiose (*Ezserohilum turcicum* Leonard e Suggs e *Bipolaris maydis* Y. Nisik e C. Miyake) e os enfezamentos pálido e vermelho (*Spiroplasma kunkelii* Delong e Wolcott) estão entre as principais doenças de maior importância econômica da cultura do milho.

2.3.1 A Cercosporiose do milho (*Cercospora zeae-maydis*)

A Cercosporiose do milho, causada pelo fungo *C. zeae-maydis*, foi descrita pela primeira vez no sul de Illinois (Estados Unidos), em 1925, por Tehon e Daniels (1925), estes autores também afirmaram que, devido ao aumento sobre plantio direto do milho sobre os restos culturais com esporos de *C. zeae-maydis*, esta doença largamente se expandiu nos anos 70. De maneira que para o ano 2000, a doença já era encontrada em vários países como Colômbia, Peru, Brasil, México, Venezuela, Moçambique, Zâmbia, Uganda, Camarões e África do Sul (DUNKLE; LEVY, 2000); tanto que os maiores danos observados foram nos Estados Unidos, e na África do Sul (MATHIONI, 2006). No Brasil esta enfermidade foi reportada pela primeira vez por Viégas e Krug, no ano 1934, em Campinas, São Paulo (VIÉGAS, 1945), porém somente a partir de 1998, são reportadas severas epidemias nas principais regiões produtoras, como por exemplo, aquela ocorrida no ano 2000, no Sudoeste de Goiás (Rio Verde, Jataí, Montividiú, Mineiros) (PINTO et al., 2004). De acordo com Carneiro, (2010), esta doença ocasionou elevadas perdas na produção do milho naquela região, expandindo-se posteriormente para as regiões de Paracatu – MG, e Dourados – MS. Atualmente a cercosporiose do milho esta confirmada nos estados de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e Bahia, de maneira que a doença ocorre com maior intensidade e severidade na safrinha (PINTO, 2014).

De modo geral, a cercosporiose pode diminuir entre 20 e 60 % da produção de grãos, dependendo do híbrido semeado e das condições de produção (CARLSON e MAIN, 1976; WARD et al., 1994; FANTIN et al., 2008). Contudo, *C. zeae-maydis* também produzi cercosporina, fitotoxina que atua como agente fotossensibilizante nas das folhas e que causa a morte das mesmas na presença de luz; após da liberação da cercosporina, esta é convertida em produtos que danificam a membrana celular e a estrutura citoplasmática ocasionando a morte da célula (DAUB e EHRENSHAFT, 2000).

A taxa de desenvolvimento da cercosporiose é determinada por três fatores que interagem no tempo e no espaço: a quantidade inicial de inóculo ou de doença; a taxa de reprodução do patógeno em um mesmo ciclo da cultura e a proporção de tecido sadio a ser infectado (KOSHIKUMO, 2007). A severidade desta doença agrava-se principalmente em condições de elevada umidade relativa e temperatura diurna variando de moderada a alta, duas condições próprias de regiões com altitudes superiores a 600 m (SILVA et al., 2001).

A sintomatologia desta doença é caracterizada pela presença de manchas necróticas nos órgãos verdes da planta, como folhas, colmos e brácteas das espigas, porém seus danos são mais visíveis nas folhas, onde o patógeno coloniza tecido foliar, induzindo à senescência e a morte antecipada das folhas, afetando desta forma a interceptação da radiação e produção, e circulação de foto-assimilados (WARD et al., 1999). Variedades suscetíveis de milho podem ser severamente afetadas antes da maturação fisiológica, sem mencionar a ocorrência do enfraquecimento da planta, podridões do colmo e tombamento da planta (WARD, 1998). O período latente da Cercosporiose pode variar de 14 dias, para híbridos mais suscetíveis e 21 dias para híbridos moderadamente resistentes (EMBRAPA, 2003).

De modo geral, a Cercosporiose do milho apresenta seus primeiros sinais durante o florescimento, principalmente nas folhas baixas, onde o aspecto das lesões é linear-retangular e geralmente delimitadas pelas nervuras; as lesões plenamente desenvolvidas apresentam comprimento de 1 a 6 cm, com 2 a 4 mm de largura, suas manchas têm coloração palha, a verde-oliva, e podem ser cobertas por esporos em condições de alta umidade relativa, adquirindo coloração acinzentada. Casela e Ferreira (2003) afirmam que já que as oito ou nove folhas superiores da planta contribuem com 75 a 90% dos nutrientes demandados pela espiga durante o processo de enchimento, os fatores mais afetados pela doença na produção são o número de grãos por espiga e o tamanho dos mesmos.

Para os aspectos microscópicos, Brunelli (2004) reportou que sobre condições ambientais favoráveis, enquanto a germinação dos esporos acontece 13 horas depois do contato entre estes com a planta, a penetração pelos estômatos inicia-se 16 horas depois de inoculação. Segundo Parlevliet, (1979) o tamanho da lesão reflete a taxa de crescimento do patógeno e a produção de esporos.

A espécie *C. zeae-maydis* apresenta conídios hialinos com um tamanho entre 40 – 165 µm de comprimento e 4 – 9 µm de largura, que são produzidos em conidióforos, agregados em fascículos, que emergem de cavidades do tecido epidermal, formando esporodóquios (PEREIRA et al., 2005; BRUNELLI, 2004). Em condições de alta umidade, o fungo presente nos restos culturais produz conídios, que são disseminados pelo vento e respingos de chuva, produzindo as primeiras infecções nas folhas inferiores de outras plantas de milho (KOSHIKUMO, 2007).

O fungo *C. zeae-maydis*, caracteriza-se por atacar somente o milho e por possuir baixa capacidade competitiva com outros microrganismos, já que sua sobrevivência depende da colonização do hospedeiro vivo ou dos restos de cultura (WARD, 1999). Normalmente, a

cercosporiose do milho pode ser controlada, utilizando variedades resistentes à doença, rotação da cultura com soja, sorgo, algodão e girassol, rotação de genótipos (híbridos o variedades), bem como com o uso de fungicidas, que além de provocar impactos negativos no ambiente, pode ocasionar aumento no custo de produção (CRAFT, 2015).

De acordo com Costa (2007), o melhor controle da doença consiste em pulverizações de azoxystrobin + cyproconazole 450 + óleo mineral parafínico 0,5 % no estágio V8 da cultura (com oito folhas desenvolvidas); de modo que o emprego de controle químico para esta doença só se justifica em cultivos de elevado valor comercial, como campos de produção de sementes, ou de milhos especiais como o doce e o pipoca (BRUNELLI, 2004). Contudo Embrapa Milho e Sorgo (2009) reportam como outras medidas para reduzir o potencial de inóculo, o estabelecimento de plantio em época adequada, a utilização de sementes de boa qualidade e tratadas com fungicidas, a rotação de culturas, o fornecimento de uma adubação equilibrada na cultura e também o emprego de cultivares resistentes. De acordo com Engelsin et al. (2011) a resistência obtida pelo componente genético é um dos métodos mais eficientes de controle de doenças foliares da cultura do milho.

2.4 Quantificação de doenças

A fitopatometria estuda e avalia os sintomas e sinais de tecido doente nas plantas; cuja quantificação é realizada mediante a incidência, a severidade e a intensidade da enfermidade (MORAES, 2007). De maneira que a incidência é um método quantitativo para medir doenças, mediante contagem de plantas doentes sem considerar a quantidade de doença em cada planta, ao passo que a severidade expressa o dano real causado pelos patógenos e é usado para determinar a porcentagem da área de tecido doente, é por tanto um método qualitativo e quantitativo, porém pode ser mais trabalhoso e subjetivo; finalmente a intensidade utiliza a incidência ou a severidade, para expressar quão doente está a planta (CRAFT, 2015).

De acordo com Campbell e Madden (1990), a obtenção de dados de severidade ao longo do tempo, permite a confecção de curva de progresso da doença, o que representa a interação do efeito do hospedeiro com o patógeno e o ambiente.

Uma maneira eficaz de representar ilustradamente plantas ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade é mediante a utilização de escalas diagramáticas,

as quais levam em consideração características próprias do hospedeiro e da enfermidade; bem como devem produzir o formato da folha ou do órgão da planta afetada e considerar o tamanho e a distribuição das lesões (ALVES e NUNES, 2012). Para casos específicos de severidade de doenças com lesões pequenas, deve-se tomar cuidado em dar valores superestimados, pois o estímulo de muitas lesões pequenas cria a ilusão de maior porcentagem de área afetada pela doença (VALE et al., 2004). Não obstante, a precisão de uma avaliação, também consiste na falta de variação na estimativa de uma unidade amostral entre diferentes avaliadores ou de um mesmo avaliador (CAMPBELL e MADDEN, 1990; NUTTER et al., 1993).

2.5 Avaliação da cercosporiose do milho

Tratando-se de enfermidades foliares, o parâmetro mais adequado para quantificar estas doenças é a severidade a qual pode ser calculada matematicamente dividindo-se a área doente da folha (l^2) pela área total da folha (L^2), multiplicado por 100, assim: Severidade = $l^2/L^2 \times 100$ (ALVES e NUNES, 2012). Não obstante na avaliação de enfermidades foliares, existe também preferência pelo uso de escalas diagramáticas, que ilustram uma série de plantas ou partes de plantas com sintomas em diferentes níveis de severidade (MATHIONI, 2006).

Por isto, para doenças foliares como a cercosporiose, o parâmetro mais empregado para a quantificação é a severidade, que avalia a porcentagem de tecido da planta com sintomas. No Brasil, as escalas diagramáticas mais utilizadas para avaliar a cercosporiose foram adaptadas de Agrocere (1996), utilizada para avaliar *Puccinia polysora*. Não obstante para experimentos com inoculação artificial, baixas condições de casa de vegetação também têm sido desenvolvidas escalas diagramáticas como a de Brunelli (2004), que emprega notas de 1 a 4 onde 1 – folha sem sintoma; 2 – folha com menos de 10 pontuações cloróticas; 3 – folhas com mais de 10 lesões cloróticas e estriadas, algumas com pontos de esporulação e 4 – folha com mais de 20 lesões cloróticas e estriadas, algumas esporulantes.

2.6 Indução de resistência em plantas

As plantas se encontram em contato contínuo com outros organismos, e sobre condições naturais, interatuam com diversos microrganismos patogênicos (ORDEÑANA, 2002). O desenvolvimento de uma doença num hospedeiro deve-se à presença de um ou mais genes no agente patogênico, que determinam a especificidade ou virulência do hospedeiro, por exemplo, populações naturais de plantas são polimórficas para a resistência à diversos fungos patogênicos, no entanto os patógenos também são polimórficos para a virulência, podendo vencer a resistência da planta, devido a sua efetividade bastante limitada. Estes polimorfismos são mantidos por contínuos ciclos de co-evolução patógeno/hospedeiro nas populações, somado ao efeito de ocasional fluxo de genes de resistência e de virulência vindos de populações distantes (Matiello et al., 1997). Outros autores, como Keen (1992), asseguram que como resultado da estreita coevolução, muitos microrganismos desenvolvem-se de uma forma patogênica em uma gama de hospedeiros limitada, ao nível de gênero, espécie e subespécie.

De modo geral, as plantas têm diversidade de mecanismos de defesa a nível celular e molecular para o combate de organismos patógenos, em que genes da planta reconhecem o patógeno, produzindo reposta de defesa contra este (LIZARRAGA et al., 2011; HAMMOND-KOSACK e PARKER, 2003). A interação entre um hospedeiro e o patógeno é uma luta pela sobrevivência, onde as células vegetais respondem à penetração do patógeno através de mecanismos estruturais e/ou bioquímicos, para repelir o ataque (PASCHOLATTI e LEITE, 1995). A expressão dos mecanismos estruturais ou bioquímicos de defesa de uma planta depende da ativação de genes, após o contato do patógeno como o hospedeiro (ARAUJO, 2009). Os mecanismos estruturais são os que promovem o atraso na penetração do patógeno e são conhecidos como pós-formados entre eles as caloses, as papilas, a lignificação, a camada de cortiça, a camada de abscisão, a tiloses entre outros (BARROS et al., 2010). Outro mecanismo de defesa das plantas é a reação de hipersensibilidade processo que inclui o detrimento da permeabilidade das membranas celulares, o aumento da respiração, o acúmulo e a oxidação de compostos fenólicos e a produção de fitoalexinas, que como resultado produzem a morte das células infectadas e as de seu entorno (ZAMORA et al., 2009). Embora, de acordo com Barros (2010), a reação de hipersensibilidade tenha sido identificada há quase 100 anos, não está claro se a morte celular é uma causa direta da resistência ou uma

consequência de mecanismos de sinalização que levariam aos eventos capazes de inibir a ação do patógeno.

No entanto existem mecanismos induzíveis que podem ser ativados sistemicamente nas células e tecidos afastados, gerando na planta a indução de Resistência Sistêmica Adquirida (SAR - pelas siglas em inglês Systemic Acquired Resistance), e com isto um conjunto de Proteínas Relacionadas à Patogênese (PRP's), como também compostos de defesa e enzimas envolvidos na síntese dos fenilpropanóides, chalcona sintase, peroxidases, proteínas ricas em hidroxiprolina, relacionadas com o fortalecimento da parede celular, além das glucanases e quitinases que hidrolisam paredes celulares de fungos (PETEIRA, 2008). Não obstante, de acordo com Mac Key (1986), a resistência também é caracterizada pela habilidade da planta de diminuir o estabelecimento de populações de patógenos, através de seu sistema de defesa direto e ativo, neste caso, a resistência é dita sistêmica e induzida (SIR), ou seja, as plantas percebem as agressões e sua alta capacidade de adaptação permite que sobrevivam, mesmo tendo muitas vezes seu desenvolvimento prejudicado (BARROS et al., 2010).

Autores como Pascholati e Leite (1995) e Smith (1996) reportaram que a indução de resistência e a ativação dos sistemas de defesa das plantas apresentam-se quando elas entram em contato com os elicitores; moléculas que uma vez adicionadas à planta favorecem o desenvolvimento de respostas de defesa, promovendo a percepção e transdução de sinais biológicos para ativar respostas a nível celular. Tais substâncias elicitoras podem ser de origem biótica, como organismos viáveis ou componentes de suas estruturas, ou de tipo abiótica, como ácido salicílico, luz ultravioleta, fosfitos, silicatos, alguns metais pesados e “terras raras” (HAHN, 1999; ANGELOVA et al., 2006).

Entretanto, para Sticher et al. (1997) a Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) e a Resistência Sistêmica Induzida (SIR), são fenômenos distintos, porém fenotipicamente parecidos pois as plantas após exposição a um agente indutor têm seus mecanismos de defesa ativados não apenas no sítio de indução como também em outros locais dele distantes, de forma mais ou menos generalizada. O termo “adquirido” refere-se quando o elicitor é um agente patogênico ou parasita e o termo “induzido” é empregado quando esse agente é benéfico simbiote ou abiótico (BARROS et al., 2010). Segundo Moraes (1992), a SAR torna a planta resistente por várias semanas às infecções posteriores e fornece proteção eficaz contra um grupo de patógenos, e não a todos, variando também de acordo com a espécie vegetal. Segundo Zamora et al. (2009), as plantas são resistentes a certos patógenos porque

apresentam genes que conferem resistência direta contra genes que determinam a virulência do patógeno em particular (resistência verdadeira) ou porque as plantas escapam ou toleram a infecção causada por estes agentes patogênicos (resistência aparente).

2.6.1 Resistência verdadeira

A resistência verdadeira à doenças é controlada geneticamente por um ou vários genes, que ativam os mecanismos de defesa da planta contra o ataque de agentes patogênicos; de maneira que o hospedeiro e o agente são mais ou menos incompatíveis pela falta de reconhecimento químico, ou quando a planta hospedeira repele os agentes patogênicos com diferentes mecanismos de defesa que são ativados em resposta à infecção (METRAUX, 2001). Segundo Agrios (2005), existem dois tipos de resistência verdadeira: a resistência horizontal (ou poligênica) e a resistência vertical (ou resistência específica):

Resistência horizontal ou resistência poligênica: Controlada por vários genes, os quais, de maneira individual, seriam ineficazes para reagir ao efeito do patógeno. A resistência horizontal é afetada pelas condições ambientais, e de modo geral, não evita que as plantas sejam infectadas, mas retarda o desenvolvimento da infecção e da disseminação da doença, e o desenvolvimento de epidemias no campo. Variedades com resistência horizontal podem variar na sua reação com o patógeno, no entanto o agente patogênico terá que sofrer diversas mutações para inibir completamente a resistência do hospedeiro (AGRIOS, 2005).

Resistência vertical ou resistência específica: As plantas podem ser resistentes a algumas raças de um patógeno, como ser resistentes também a uma raça particular do patógeno e susceptível a outra. Este tipo de resistência é controlado por um ou poucos genes, que apresentam um efeito significativo sobre a interação com o patógeno, inibindo o desenvolvimento inicial do mesmo. As plantas com resistência vertical mostram resistência completa a um patógeno específico, contudo uma ou mais mutações no patógeno podem originar uma nova raça com capacidade de infectar a planta anteriormente resistente. Embora as variedades com resistência horizontal sejam menos estáveis, elas podem variar na sua reação com o patógeno, de maneira que o agente patogênico terá que sofrer diversas mutações para inibir completamente a resistência do hospedeiro (AGRIOS, 2005).

2.6.2 Resistência aparente

A resistência aparente é um fenômeno em que plantas susceptíveis permanecem livres de infecção e apresentam comportamento de variedades resistentes. A resistência aparente faz com que algumas plantas desenvolvam-se frente às doenças às quais são susceptíveis, e como resultado obtém-se processos denominados de escape e tolerância. O escape ocorre quando os três componentes do triângulo etiológico (hospedeiro susceptível, patógeno virulento e condições ambientais favoráveis) não coincidem no tempo, e a tolerância, quando a planta tem a capacidade de continuar com seu desenvolvimento fisiológico, mesmo se elas encontram-se infectadas por um agente patogênico (ZAMORA et al., 2009).

2.6.3 Indutores de resistência

Dentre os produtos alternativos, os indutores de resistência destacam-se por apresentar eficiência no controle de doenças em várias culturas e por ser praticamente atóxicos, não deixando, por tanto resíduos danosos à saúde humana e ao ambiente (RESENDE et al., 2007).

Posteriormente à sua identificação, na década de 90, sabe-se que o Acibenzolar S-metil (ASM, Bion®) age como indutor de resistência em diferentes espécies vegetais, fato que incrementou significativamente o avanço na indução de resistência como ciência (RESENDE et al., 2000; 2007). No Brasil, o Acibenzolar-S-metil, foi registrado no ano de 2001 sob a marca comercial Bion® como um produto capaz de eliciar respostas de resistência em plantas contra diferentes patógenos (DANTAS, 2004).

Produtos comerciais recentemente lançados exibem características de indutores de resistência e são derivados de extratos vegetais e óleos essenciais, os quais constituem uma importante fonte de agentes biocidas que podem ser largamente utilizados na agricultura (ALVES e PERINA, 2014). De acordo com Ribeiro e Resende (2012) existem produtos no mercado com eficácia na indução de resistência em plantas como são Oryzmate® (Probenazol), Bion® (Acibenzolar-S-etil), Messenger® (Harpin), Elexa® (Quitosana); Agromós® (derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*), Milsana® (extrato de *Reynoutria sachalinesis*), Ecolife® (biomassa cítrica), Iodus (extrato de *Laminaria digitata*).

O silício também tem sido relatado como um elemento capaz de induzir resistência em plantas, como por exemplo, em plantas de arroz (*Oryza sativa* L.), cultivadas com doses crescentes deste elemento (RODRIGUES et al., 2003).

Também são considerados indutores os biofertilizantes que podem atuar como potentes elicitores de resistência sistêmica induzida, provavelmente devido à diversidade biótica e abiótica da composição final destes fermentados (BARBOSA e MEDEIROS, 2007); por conter diversidade de microrganismos como bactérias, leveduras, fungos filamentosos, actinomicetos e protozoários entre outros, os biofertilizantes possuem atividade bioativa que ativa a resistência Sistêmica Adquirida e a Resistência Sistêmica Induzida, cujo processo é possível graças aos estímulos ou sinais transportados pelos mediadores químicos ou “medioquímicos” presentes nesses produtos sobre sítios fitoreceptores da planta, produzindo, por tanto, reações de defesas em tecidos distantes do vegetal (BARROS et al., 2010; BARBOSA e MADEIROS, 2007).

De acordo com Silva et al. (2003), o uso indiscriminado de indutores também pode levar a resultados nem sempre benéficos, pois a ativação de resistência demanda gasto energético por parte da planta para a organização do seu metabolismo de defesa.

2.7 Proteínas relacionadas à patogênese (PRP's)

As proteínas de defesa vegetal ou proteínas relacionadas à patogênese (PRPs) foram estudadas pela primeira vez em plantas de fumo e foram descritas como macromoléculas envolvidas no fenômeno da resistência induzida, as quais se expressam também em condições de estresse biótico e abiótico (ROMEIRO, 2008), de maneira que a resistência traduz-se por alterações no metabolismo da célula vegetal, entre elas a síntese de proteínas de defesa, expressas por genes específicos (Pinto, 2011). Estas proteínas são codificadas por genes que são rapidamente induzidos por infecções patogênicas, pelo ácido salicílico (SA), ácido jasmônico (JA) e etileno (ET), além de fatores ambientais (SEO et al., 2008). Segundo Jones e Dangl (2006), as PRP's exercem diferentes funções na resistência da planta, atuando de forma direta no combate de patógenos ou de forma indireta, mantendo a estrutura e as funções da célula. De modo geral estas proteínas são solúveis, apresentam baixo peso molecular e resistem a proteases (GUZZO, 2004). De acordo com Van Loon et al. (2006), existem 17 famílias de PRP's classificadas de acordo a suas propriedades bioquímicas e moleculares. As

mais pesquisadas são as PR-1, que contém as primeiras PR's, PR-2 (β -1,3 glucanases), PR-3 (quitinases) e PR-5 (Osmotina).

Para a determinação de proteínas totais, o método mais empregado é o do biureto de Lowry, do “Coomassie Brilliant blue” BG-250 ou reagente de Bradford, do BCA ou reagente de Smith, e de absorção de proteínas no ultravioleta (ZAIA, 1998). O método Bradford, baseia-se na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contêm aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 gera o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve intensamente em 595 nm. Este método tem sido aproveitado para a determinação de proteínas totais em diferentes meios como plasma, soro sanguíneo, líquido, saliva humana, produtos alimentícios, leite humano, suspensões de células, avidina e estreptavidina, urina, detergentes e tecidos de plantas (ZAIA, 1998).

2.7.1 Atividade de peroxidase

As peroxidases (EC 1.11.1.7) (POXs) são consideradas proteínas de resposta ao estresse, que atuam como catalisadoras de vários processos biológicos degradando o peróxido de hidrogênio proveniente do metabolismo do oxigênio nas células a fim de transformá-lo em água e oxigênio (PILA, 2013). Se por um lado, as peroxidases são proteínas relacionadas à patogênese específicas para o aceptor de hidrogênio, sendo ativos somente metil, etil e peróxidos; por outro lado elas são inespecíficas para os doadores de hidrogênio, como fenóis, aminofenóis, diaminas, indofenóis, ascorbatos e diferentes aminoácidos (VAN LOON e VAN STREIN, 1999). Outros autores como Cavalcanti et al. (2005) reportam que as peroxidases são glicoproteínas com massa molecular em torno de 40 kDa, capazes de gerar o H_2O_2 que lhes serve como substrato.

A peroxidase encontra-se envolvida em diferentes reações, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, cicatrização de ferimentos, oxidação de fenóis, defesa de patógenos, regulação da elongação de células entre outras (CAMPOS et al., 2004). Esta enzima também toma parte de uma variedade de processos fisiológicos nas plantas como a suberização, a lignificação, a formação e reticulação de componentes da parede celular, o catabolismo de auxinas, a senescência e a proteção contra-ataques de patógenos, insetos e estresses abióticos (SIMON,

2016). A peroxidase pertence ao grupo das oxidoreduktases são capazes de catalisar diferentes reações oxidativas em plantas, aproveitando o peróxido como substrato, ou, o oxigênio como um aceptor de hidrogênio.

Autores como Barros (2010); afirmam que o processo de lignificação pode inferir no crescimento de patógenos mediante modificações químicas nas paredes celulares, além disso, a peroxidase apresenta uma estreita relação com diferentes processos de defesa na planta, como são a resposta de hipersensibilidade, suberização e produção de fitoalexinas.

De acordo com Araujo (2008), esta enzima é considerada uma enzima termo resistente, que quando é ativada os microrganismos patogênicos são destruídos. Não obstante, as peroxidases são bastante estudadas por sua importância em processos de defesa, já que na maioria das vezes, o aumento na atividade desta enzima, está diretamente relacionado à redução da severidade de uma doença (KUHN, 2007).

2.7.2 Atividade de catalase

A catalase (EC 1.11.1.6) é uma enzima de desintoxicação que degrada H_2O_2 em H_2O e O_2 ; esta enzima encontra-se em quase todos os microrganismos aeróbicos e em algumas células anaeróbicas, onde controla processos de oxidação em tecidos com um aumento da concentração de H_2O_2 (ARAUJO 2008). Segundo Airaki et al. (2012), a catalase proveniente da difusão de H_2O_2 é uma enzima essencial no mecanismo de defesa contra diferentes tipos de estresse. De acordo com Del Rio et al. (2006), a atividade desta enzima encontra-se localizada de maneira exclusiva nos peroxissomos. Esta enzima é responsável pela dismutação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , de maneira que remove o peróxido produzido nos peroxissomos por oxidases envolvidas na oxidação de ácidos grãos, fotorrespiração e catabolismo de purinas (GIL e TUTTEJA, 2010).

A função principal da catalase é prevenir os efeitos danosos produtos das mudanças na homeostase do H_2O , além disso, ela pode oxidar substratos tais como o metanol, o etanol, o formaldeído e o ácido fórmico (VAN BREUSEGEM et al., 2001). De modo que este sistema é acionado quando as plantas são atacadas por fungos fitopatogênicos (GAYATRIDEVI et al., 2012). A catalase ao encontrar-se envolvida na detoxificação de peróxido de hidrogênio é uma enzima muito estudada no processo de indução de resistência, além que após a aplicação de um agente elicitador apresenta-se aumento da atividade desta enzima (MENEZES, 2009).

2.7.3 Atividade de polifenoloxidase

As polifenoloxidasas (EC 1.10.3.2) (PFOs) são enzimas intracelulares que ocorrem em animais, plantas, em várias espécies de bactérias e em numerosos fungos (ITAKO, 2009). As POFs, também são denominadas, de acordo com Okot-Kotber et al. (2002), como fenol oxidasas, catecolases, fenolases, catecol oxidasas ou tirosinases.

As polifenoloxidasas são enzimas localizadas nos plastídios e encontram-se geralmente relacionadas a tecidos infectados, ou envolvidas nos mecanismo de defesa e senescência (AGRIOS, 2005). Autores como Constabel et al. (1995) afirmam que as polifenoloxidasas encontram-se distribuídas em todas as estruturas das plantas, sendo sua expressão induzida por ferimentos, porém podendo alguns órgãos ou tecidos conter maiores concentrações, de maneira que o seu nível pode variar em função da espécie, da cultivar ou do ambiente.

A polifenoloxidase reúne um conjunto de enzimas que catalisam a reação de oxidação de polifenóis transformando-os em quinonas também conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases (OKO-KOTBER et al., 2002). Por exemplo, as quinonas no processo de defesa celular desempenham-se como fator aninutritivo para insetos, já que os taninos na forma fenólica são oxidados a quinonas apresentando alta reatividade com as proteínas da dieta do inseto, impedindo que possa digeri-las (TAIZ e ZEIGER, 2009). No entanto, após a ruptura da célula pelo patógeno, a PFO é liberada dos tilacóides oxidando os compostos fenólicos que também são liberados dos vacúolos, produzindo quinonas que apresentam ação antimicrobiana (LIU et al., 2005).

A maioria dos compostos identificados como funcionais no tratamento de certas doenças são compostos fenólicos, que são o substrato perfeito para uma enzima chamada polifenoloxidase (PFO), a qual na presença de oxigênio é capaz de oxidá-lo (DING et al., 2001). Além disso, esta enzima encontra-se diretamente envolvida no processo de escurecimento em alimentos (síntese de quinonas), principalmente em frutas e vegetais durante o processamento e armazenamento (CARNEIRO et al., 2008).

2.7.4 Atividade de β -1,3 glucanase

A enzima β -1,3 glucanase (EC 3.2.1.6) é encontrada em diversos vegetais, porém é também produzida por alguns fungos filamentosos e leveduriformes, assim como por bactérias. As glucanases são polímeros de açúcar formados por centenas de unidades monossacarídicas, que diferem entre si pelas ligações glicosídicas que as unem. Em geral, estes polímeros podem ser de origem vegetal, como a celulose, no entanto, existem as glucanases de origem animal, como o glicogênio (BAUEMEISTER et al., 2010).

Estas enzimas ocorrem em formas básicas intracelularmente e em formas ácidas extracelularmente e possuem ação direta contra patógenos (MARTINS, 2008), além disto, as β -1,3-glucanases são enzimas encarregadas da hidrólise de ligações glicosídicas do tipo β -1,3 (principal componente da parede celular dos fungos) em β -D-glucanas, liberando glucose como produto principal (VANLOON e VAN STREIEN, 1999).

Segundo Romeiro (2008), as glucanases acopladas com as quitinases agem sinergicamente para diminuir o crescimento do patógeno, no entanto as β -1,3 glucanases também têm a capacidade de liberar fragmentos glicosídicos da parede celular do patógeno e da própria planta, que serviram como elicitores de defesas do hospedeiro. Esta enzima também atua no metabolismo de estresse e resistência a alguns fitopatógenos (ITAKO, 2009).

2.7.5 Fitoalexinas

Muller e Borger em 1941 apontaram como fitoalexinas aos compostos químicos sintetizados pela planta em resposta à uma invasão microbiana; de maneira que a primeira fitoalexina isolada e caracterizada em 1960 por Cruickshank e Perin a partir do composto isolado de ervilha (*Pisum sativum*), era um isoflavonoide pterocarpano, que foi chamado de písatina (VIVANCO et al., 2005).

As plantas apresentam outra maneira de defender-se, mediante a síntese de fitoalexinas, que são substâncias com ação antimicrobiana. Segundo Deffune (2001), as fitoalexinas constituem diferentes compostos de defesa, como antimicrobianos do grupo dos isoflavonóides e sesquiterpenos, além de outros agentes elicitores como alcalóides, flavonóides, terpenóides, cumarinas, sulfitos, glucosídios, taninos, purinas e ácidos graxos

orgânicos. De acordo com o mesmo autor, as fitoalexinas podem-se acumular para limitar o crescimento do patógeno e são tóxicas para os protoplastos.

Para Braga (2008), as fitoalexinas apresentam natureza química variada, agindo sobre microrganismos com baixa especificidade, e seu modo de ação induz a efeitos tóxicos sobre as células do organismo parasito, inibindo seu crescimento ou produzindo até a morte do patógeno. Contudo, as fitoalexinas apresentam poder biocida, sendo capazes de prejudicar o desenvolvimento de bactérias, fungos, nematóides, plantas e animais, de maneira que a sua ação sobre os fungos inclui a granulação citoplasmática, a desorganização dos conteúdos celulares, a ruptura da membrana plasmática e a inibição de enzimas (CAVALCANTI et al., 2005).

O uso de produtos como o leite fermentado por *Lactobacillus* e de probióticos, vem sendo estudados como uma alternativa viável para o controle de doenças de plantas, já que equilibram e ativam mecanismos de defesa em plantas, diminuindo o desenvolvimento de enfermidades (BETTIOL, 2004), por exemplo, no estudo de Curti (2010), sobre a síntese de fitoalexinas em sorgo e soja, controle de oídio e produção de pepino mediante a aplicação de produto lácteo fermentado. Encontrou mediante os resultados que este produto apresenta capacidade elicitora, demonstrada pela produção de gliceolinas em cotilédones de soja além da produção de deoxiantocianidinas em mesocótilos de sorgo.

A utilização de cotilédones de soja é uma excelente ferramenta para avaliar a ação elicitora de moléculas de origem biótica e abiótica em diferentes estudos (MESQUINI et al., 2007).

2.7.6 Clorofila *a*, *b* e total

As clorofilas são os pigmentos verdes naturais mais abundantes presentes nas células vegetais fotossintéticas, os quais são sintetizados sobre tudo nas folhas pelos cloroplastos, organelas em cujas membranas dos tilacoides ocorrem a fase fotoquímica, bem como a fase bioquímica, que ocorre no estrômato (STREIT, 2005). Apesar de todas as plantas terem cloroplastos e clorofilas, existem diferenças na cor dos vegetais, a qual é atribuída a presença e a distribuição variável de outros pigmentos associados às clorofilas, como por exemplo, os carotenóides (VON ELVBE, 2000). Nas folhas, o conteúdo de clorofila é empregado para avaliar o potencial fotossintético das plantas, de acordo a sua ligação direta com a absorção e

a transferência de energia luminosa. Em geral, uma planta com elevada concentração de clorofila é capaz de chegar a taxas fotossintéticas mais altas, devido a seu valor potencial de captação de “quanta” na unidade de tempo. Contudo, esta relação nem sempre existe, já que a etapa bioquímica da fotossíntese ou fase do escuro pode limitar o processo (EMBRAPA, 2004).

A eficiência fotossintética das plantas encontra-se estreitamente ligada ao crescimento e à adaptabilidade a diferentes ambientes, e é medida de acordo ao conteúdo de clorofila e carotenóides. A concentração destes pigmentos, a proporção entre eles e entre as clorofilas *a* e *b* varia segundo a intensidade luminosa. A clorofila *a* (Ch1 *a*) encontra-se em todos os organismos capazes de realizar fotossínteses oxigênica, este pigmento é utilizado para realizar o primeiro estágio do processo fotossintético; todavia existem pigmentos acessórios como a clorofila *b*, que ajudam na absorção de luz e na transferência de energia radiante (TAIZ e ZIEGER, 2004). De modo geral, as clorofilas *a* e *b*, são encontradas na natureza numa proporção de 3:1 (VON ELBE, 2000), de maneira que, juntamente com os pigmentos acessórios, elas permitem às plantas captar maior luz solar pela ativação do seu sistema fotossintético (TAIZ e ZAIGER, 2004), podendo, por tanto constituírem um adequado parâmetro indicativo de estresses bióticos e abióticos nas plantas (CODOGNOTTO et al., 2002).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Experimento 1: Produtos naturais fermentados: ativação de mecanismos de defesa em milho pipoca

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Controle Alternativo e Indução de Resistência no bloco T33 da Universidade Estadual de Maringá entre os meses de Junho de 2015 e Maio de 2016, em Maringá, PR.

3.1.2 Indutores de resistência

Para testar a indução de proteínas relacionadas à patogênese no milho pipoca foi utilizado o adubo biológico Microgeo[®], componente balanceado que nutre e regula e mantém a produção contínua do biofertilizante através do processo de Compostagem Líquida Contínua (CLC), e que contém em sua composição, preparados biodinâmicos, substâncias recalcitrantes, pentoses, minerais e farelos, com as funções de regular a produção de adubo biológico mantendo a fermentação contínua e evitar a fermentação alcoólica, ácida ou láctea. A Biofábrica CLC destinada a produzir de forma contínua o adubo biológico, é composta de tanque, registro, pré-filtro e agitador. A dose de Microgeo[®] recomendada para a cultura do milho é de 150 L h⁻¹ na pós-emergência da cultura (v1 a v2); já para aplicação foliar a dose recomendada é de 0,03L de Microgeo[®] por litro de água, podendo ser aplicada entre 3 e 4 vezes durante o ciclo da cultura (Microgeo[®], 2015). Este produto foi escolhido para testar como indutor de resistência, já que de acordo com Barbosa e Madeiros (2007), os biofertilizantes podem atuar como potentes elicitores de Resistência Sistêmica Adquirida e de Resistência Sistêmica Induzida, provavelmente devido à diversidade biótica e abiótica da composição final destes fermentados.

Além do produto supracitado, foi igualmente testado como indutor um Bioformulado elaborado a base de fermentação de folhas verdes de capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf). A escolha desta planta para a elaboração do Bioformulado foi baseada no fato que autores como Bettiol (2004), reportaram que produtos naturais fermentados ou de probióticos

ativam os mecanismos de defesa das plantas; além disso, Curti (2010), reportou que a aplicação de um produto lácteo fermentado induziu gliceolinas em soja e deoxiantocianidinas em sorgo.

3.1.3 Semeadura do milho pipoca

O experimento foi realizado em casa de vegetação, utilizando-se vasos com capacidade de 3 L (Figura 1) contendo o substrato composto de uma mistura de duas partes de solo esterilizado, com uma parte de areia esterilizada (2:1). Em cada vaso foram semeadas três sementes de milho pipoca, pertencentes à variedade “Pará”, para um total de 11 tratamentos e oito repetições por tratamento.

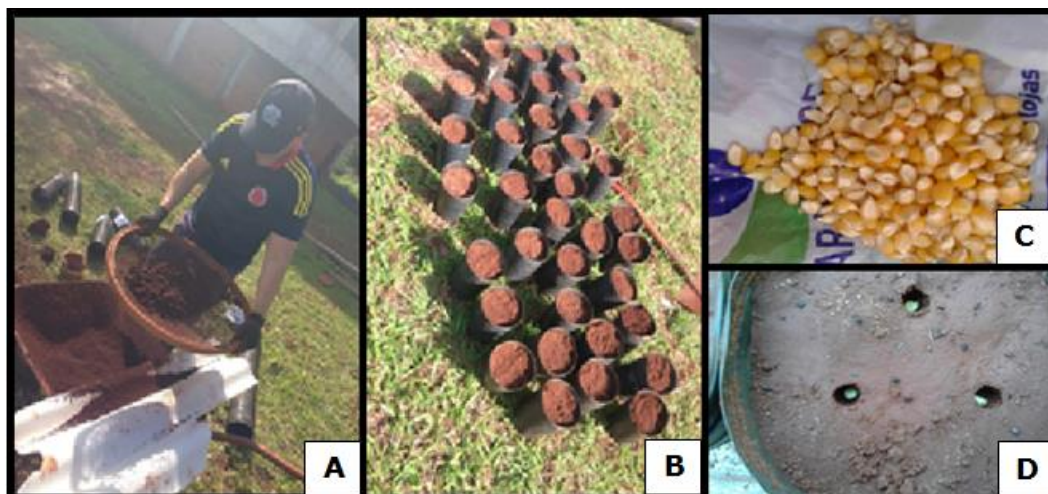


Figura 1. Semeadura do milho pipoca. **A-** Peneiramento do solo e mistura com areia. **B-** Vasos de três L com o substrato. **C-** Sementes de milho pipoca, variedade Pará. **D-** Plantio (Posso, 2017).

3.1.4 Aplicação dos tratamentos

Aos 10 dias após a germinação, enquanto um grupo de plântulas de milho pipoca foi tratado com Microgeo[®], em outro grupo empregou-se o Bioformulado (Figura 2). Para ambos os produtos, se prepararam 100 mL das diferentes concentrações (0%; 0,5%, 1,0%, 1,5%, 3,0%, 5,0%) e com uma única aplicação foliar foram borrifadas cada oito plantas por tratamento até o ponto de escorrimento; as plantas tratadas permaneceram em casa de

vegetação por um período de sete dias. Como testemunha, empregaram-se plantas tratadas com água destilada. Para cada tratamento foi aferido o pH do fermentado aplicado (Tabela 1).

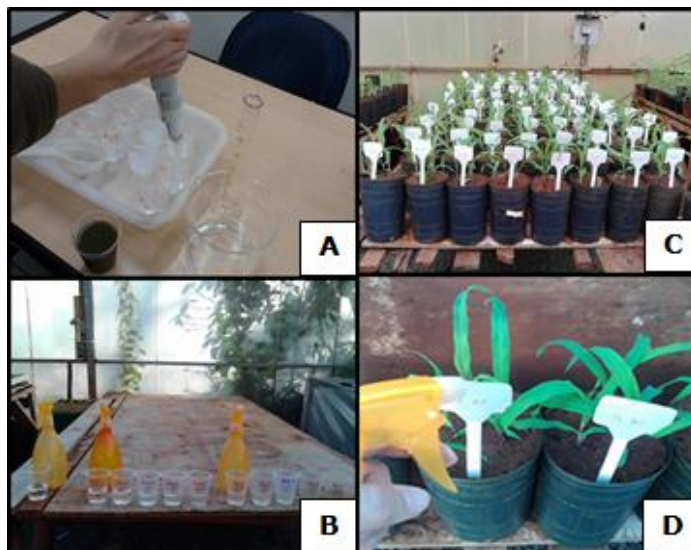


Figura 2. Aplicação dos tratamentos. **A-** Dosagem de Microgeo® e do Bioformulado. **B-** Borrifadores para cada tratamento. **C-** Rotulagem das plantas. **D-** Aplicação folhar dos tratamentos (Posso, 2017).

Tabela 1. Valores de pH dos fermentados aplicados na cultura do milho pipoca, no momento da aplicação

CONCENTRAÇÃO (%)	BIOFORMULADO (pH)	MICROGEO® (pH)
0,5	7,43	7,19
1	7,54	7,2
1,5	7,66	7,26
3	7,68	7,29
5	7,74	7,29
100	7,42	6,78

3.1.5 Coleta das amostras

A cada 24, 48, 72, 96 e 120 horas após da aplicação dos produtos, uma folha primária foi destacada, lavada em água destilada e conservada em gelo e posteriormente pesadas em balança de precisão (Figura 3).

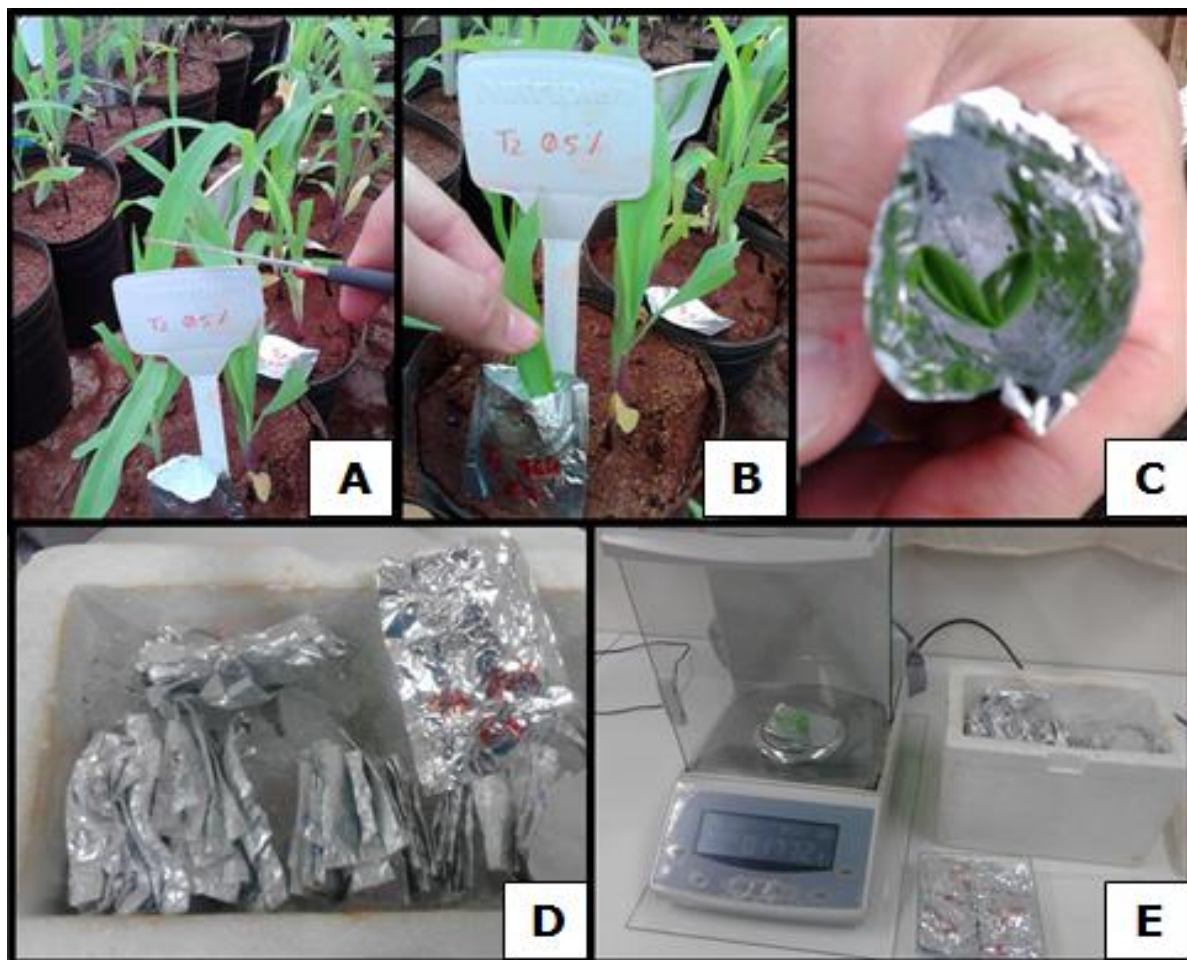


Figura 3. Coleta das amostras. **A-** Coleta de folhas destacadas. **B/C-** Armazenamento da folha em papel alumínio. **D-** Armazenamento em gelo. **E-** Pesagem das amostras (Posso, 2017).

3.1.6 Preparo do extrato enzimático

O tecido coletado foi submetido a trituração e maceração em almofariz na presença de N_2 líquido, homogeneizado em tampão fosfato 50 mM e (pH 7,0) + EDTA 0,1 mM (Figura 4). Posteriormente, o homogeneizado foi transferido para dois tubos de microcentrifuga (2 mL) por amostra (Figura 5), os quais foram centrifugados por 30 minutos a 12000 rpm / 4°C, de maneira que o sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático para a determinação de proteínas totais e da atividade enzimática de peroxidase, catalase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase. Este extrato enzimático foi transferido para tubos de microcentrifuga (2mL) previamente rotulados e armazenados a -20°C até o momento da quantificação (Figura 5).

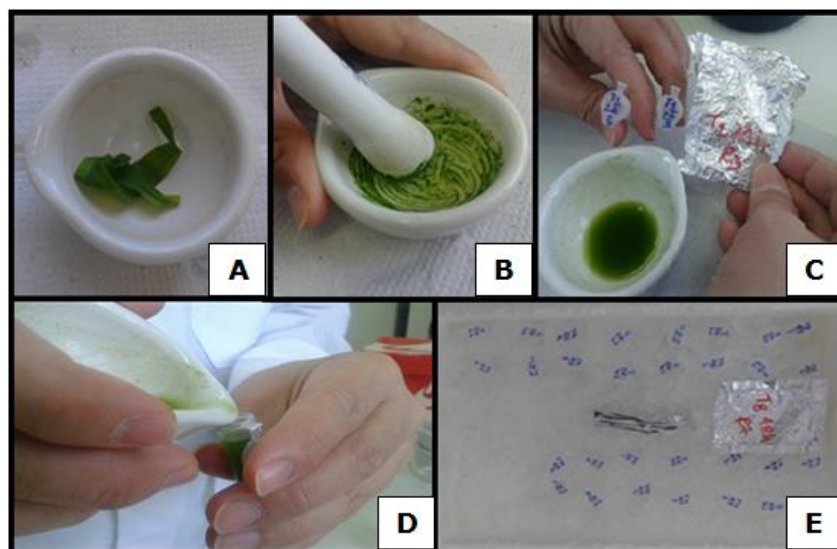


Figura 4. Preparação do extrato enzimático. **A-** Folha em N₂ líquido. **B-** Folha macerada com poli vinil fosfato. **C-** Homogeneização com 4mL de tampão fosfato. **D-** Transferência a tubos de microcentrifuga de 2mL. **E-** Armazenagem em gelo do extrato enzimático (Posso, 2017).

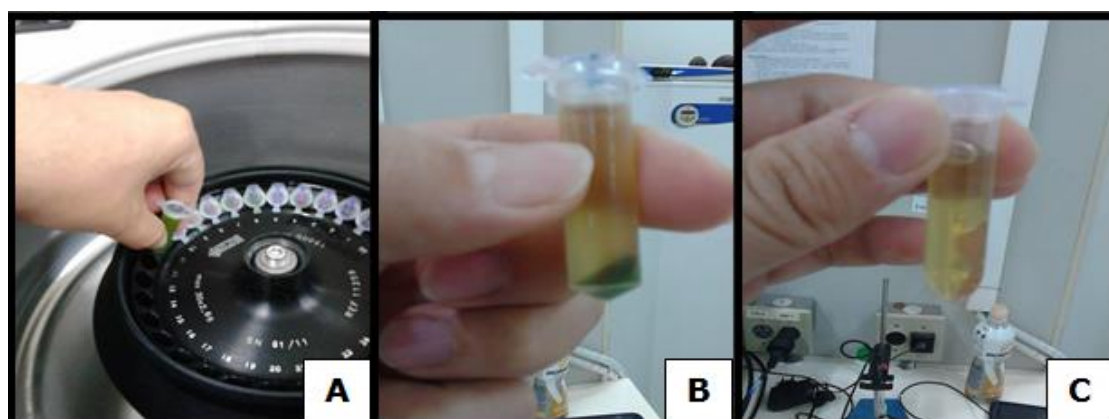


Figura 5. **A-** Centrifugação do extrato enzimático. **B-** Sobrenadante e precipitado. **C-** Obtenção do sobrenadante (Posso, 2017).

3.2 Análise enzimática

As análises enzimáticas foram feitas em duplicata (2 tubos de microcentrifuga com 2 mL de extrato enzimático). O extrato enzimático foi utilizado para testar o conteúdo de Proteínas Totais e das enzimas Peroxidase, Catalase, Polifenoloxidase e β -1,3 Glucanase.

3.2.1 Proteínas totais

Para a determinação de proteínas totais foi empregado o método Bradford (1976), que mede a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante Coomassie Brilliant Blue-BG-250. O preparo do reagente Bradford consistiu de 0,06g de BG-250 diluídos em 100 mL de H_3PO_4 e 50mL de etanol a 95% e posteriormente completado com 850 mL de água destilada. Em 50 μ L do extrato enzimático (conforme o item 3.5), adicionou-se 2,5 mL de reagente Bradford e misturou-se em vórtex. Após 5 min incubação, foi realizada a leitura em cubeta de vidro a 595 nm de absorbância em espectrofotômetro. Como branco, foi utilizado 50 μ L de água destilada com 2,5 mL de Bradford. A concentração de proteínas de cada amostra, foi expressa em mg de proteína por mL de amostra ($\text{mg proteína mL}^{-1}$), cuja absorbância foi plotada em curva padrão de proteína (ASB) ($Y=0,845x-0,0227$), onde Y é a absorbância a 595nm e X a concentração de proteína a cada 0,5 mg mL^{-1} de albumina de soro bovino (Apêndice A).

3.2.2 Atividade de peroxidase de guaiacol

A atividade de peroxidase foi determinada a 30 °C, através do método espectrofotométrico direto, pela medida da conservação do guaiacol em tetraguaiacol a 470 nm (HAMMERSCHMIDT et al., 1982; LUSSO e PASCHOLATI, 1999). A mistura da solução consistiu de 2,9 mL do substrato para enzima, 306 μ L de peróxido de hidrogênio, 250 μ L de guaiacol a 2% e 87,5 mL de tampão fosfato 0,01M (pH 6,0) e 100 μ L de extrato enzimático (conforme o item 3.5). A reação foi seguida em espectrofotômetro a 470 nm, por um período de 2 min. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em $\text{ABS. min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$.

3.2.3 Atividade de catalase

A atividade da catalase foi determinada pelo complexo estável formado pelo molibdato de amônio com peróxido de hidrogênio (TOMANKOVÀ et al., 2006). Uma alíquota de 100 μ L do extrato enzimático (conforme o item 3.5) foi incubada em 0,5 mL de

mistura de reação contendo 60 mM de peróxido de hidrogênio em tampão fosfato de potássio 60 mM pH 7,4 a 38°C durante 4 min. Após este período adicionou-se 0,5 mL de 32,4 mM de molibdato de amônio para paralisar a reação e deter o consumo de peróxido de hidrogênio pela enzima no extrato. Além disto, preparou-se um branco para cada amostra, mediante a adição de molibdato de amônio à mistura de reação, sem ter em conta o período de incubação. A leitura do complexo amarelo formado pelo molibdato e peróxido de hidrogênio foi quantificado a 405 nm em espectrofotômetro. A diferença entre a absorbância do branco e a amostra incubada determinou a quantidade de peróxido de hidrogênio utilizado pela enzima. A concentração de H₂O₂, foi determinada utilizando-se o coeficiente de extinção $\epsilon = 0,0655 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}$ e expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.2.4 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase foi determinada pela metodologia descrita por Dungmal e Apenten (1999), para quantificar a oxidação do catecol convertido em quinona, reação medida pela enzima polifenoloxidase. O substrato para enzima consistiu de uma concentração de 20 mM de catecol, dissolvido em tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 6,8). A reação foi conduzida a 30°C, pela adição de 100 μL do extrato enzimático (conforme o item 3.5), em 900 μL do substrato para posterior leitura em espectrofotômetro a 420 nm, pelo método direto, durante 2 min. A atividade foi determinada pela variação ocorrida entre os valores extremos situados na faixa de incremento linear, e expressa em $\text{Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ proteína.

3.2.5 Atividade de β -1,3 glucanase

A atividade de β -1,3 glucanase foi determinada pela quantificação colorimétrica de açúcares redutores liberados com laminarina (VOGELSANG E BARZ, 1993). Para isto, adicionou-se 150 μL do extrato enzimático (conforme o item 3.5) em 150 μL de laminarina (1,5 mg mL^{-1}) em tampão de extração. Como controle, empregou-se a mesma reação, somente que a laminarina foi colocada antes da incubação. A incubação para a reação foi mantida a temperatura 40 °C durante 60 min, em banho-maria. Após o período de incubação, retirou-se

uma alíquota de 30 µL dos tubos incubados em adição de 1,5 mL de PAHBAH (0,5 g de hidrazida do ácido 4-Hydroxybenhydrazide diluída em 20 mL de HCl 0,5M e acrescentada com 80 mL de NaOH 0,5M), cuja mistura foi mantida em banho-maria à 100°C por 5 min e posteriormente resfriadas em banho de gelo. Os açúcares redutores formados foram quantificados pelo método de Lever (1972). A leitura da absorbância determinou-se a 410 nm, em espectrofotômetro descontando-se os valores de absorbância do branco, sendo que a quantidade de açúcares foi determinada utilizando-se a curva-padrão de concentrações de glicose ($Y=1,1512x+0,205$), onde Y é a absorbância a 410 nm e X a concentração de açúcares redutores (µg) e os resultados expressos em mg de glicose.min⁻¹.mg⁻¹ de proteína (Apêndice B).

3.2.6 Produção de gliceolinas em soja

Sementes de soja (*Glycine max*) da cultivar convencional BRS 184, de crescimento determinado foram semeadas em areia esterilizada e mantidas em casa de vegetação. Após um período de nove dias, os cotilédones foram destacadas das plântulas, lavados em água destilada e cortados em secção aproximada de 1 mm de espessura e 6 mm de diâmetro na superfície inferior. Cinco cotilédones foram colocados em placa de Petri com papel filtro umedecido com água destilada estéril. Sobre cada cotilédone aplicou-se uma alíquota de 60 µL dos tratamentos. As placas de Petri com os cotilédones foram mantidas a 25°C no escuro por 20 horas. Em seguida os cotilédones foram transferidos para tubos de ensaio contendo 15 mL de água destilada esterilizada. Estes tubos permaneceram em agitação por uma hora para a extração das gliceolinas formadas. A absorbância foi determinada a 285 nm (AYERS et al., 1976). Os resultados foram expressos em ABS .gpf⁻¹.

3.3 Delineamento experimental e análise de dados

Cada unidade experimental foi representada por um vaso contendo três plantas de milho. Os ensaios envolvendo as análises enzimáticas foram conduzidos em duplicata, com um delineamento inteiramente casualizado e oito repetições. Foram atendidos os pressupostos da homogeneidade das variâncias e da distribuição dos dados, sendo determinados pelo teste Levene e Shapiro-Wilk respectivamente. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de

variância ($p < 0.05$) pelo teste F e as médias dos tratamentos foram analisadas pelo teste de Tukey e posterior análise de regressão para avaliar as diferentes dosagens dos tratamentos. Foi utilizado o programa de análise estatística e planejamento de experimentos SISVAR 5.6.

3.4 Experimento 2: Produtos naturais fermentados: controle de Cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*) em plantas de milho pipoca tratadas com Microgeo® e Bioformulado a base de capim limão

3.4.1 Obtenção e preparo do inóculo

O isolado de *C. zeae-maydis*, utilizados neste estudo foi obtido da coleção de fungos do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Estadual de Maringá. Este isolado encontrava-se armazenado em água deionizada estéril junto com óleo mineral a 4°C. Para a multiplicação, o mesmo foi transferido para placas de Petri com meio de cultura V8 (por litro de água, foram adicionados 150 mL de V8, 20 gramas de ágar, 3 gramas de CaCO_3) e mantido a 24°C sob fotoperíodo de 12h luz e 12 horas no escuro durante 15 dias (Figura 6).



Figura 6. Multiplicação dos isolados de *Cercospora zeae-maydis* em meio V8 (Posso, 2017)

3.4.2 Multiplicação do inóculo de *Cercospora zeae-maydis* em grãos de sorgo

De acordo a metodologia proposta por Mathioni (2006), o inóculo foi preparado transferindo-se cinco discos do meio V8 colonizados por *C. zeae-maydis*, a erlenmeyers de 125 mL em adição com 20 gramas de grãos de sorgo, previamente umedecidos com 16 mL de água destilada e autoclavados por 20 minutos a uma atmosfera de pressão. O inóculo foi

mantido em BOD a 25 °C com 12 horas de luz, 12 horas de escuro por um período de 15 dias para permitir ao patógeno colonizar e esporular nos grãos de Sorgo (Figura 7).



Figura 7. Inoculação dos grãos de sorgo com *Cercospora zeae-maydis*. **A-** Erlenmeyers de 125 mL em adição com 20 gramas de grãos de sorgo, previamente umedecidos com 16 mL de água destilada e autoclavados. **B-** Placas com discos do meio V8 colonizados por *C. zeae-maydis*, **C-** Erlenmeyer de 125 mL com os grãos de sorgo e discos colonizados por *C. zeae-maydis* (Posso, 2017).

3.4.3 Inoculação das plantas de milho pipoca com *Cercospora zeae-maydis*

O experimento em casa de vegetação foi conduzido entre os meses de Novembro, de 2016 a Janeiro de 2017. Em cada vaso (capacidade 5L) contendo um substrato composto de uma mistura de duas partes de solo esterilizado, por uma parte de areia esterilizada (2:1 p:p) (Conforme Figura 1A), foram semeadas duas sementes de milho pipoca. Quando as plantas de milho apresentaram entre três e quatro folhas desenvolvidas (estádio vegetativo V3) (Figura 8), foram inoculadas de acordo a metodologia proposta por Lima (2012), em que se deposita 15 sementes de sorgo colonizadas pelo fungo no cartucho das plantas de milho. Após a inoculação, os vasos foram mantidos em câmara úmida em condições de alta umidade através de irrigações diárias por um período de 30 dias (Figura 9).

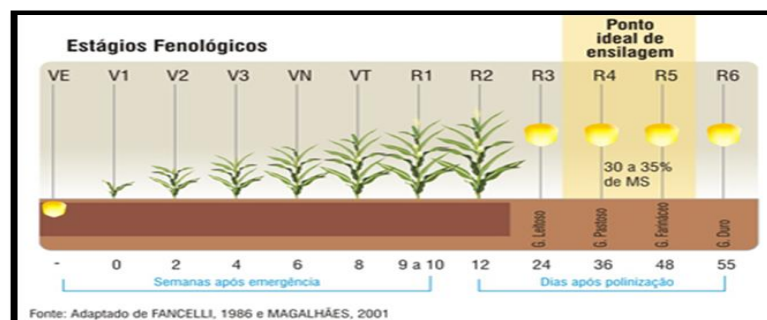


Figura 8. Estágios fenológicos do milho (Magalhães, 2001).

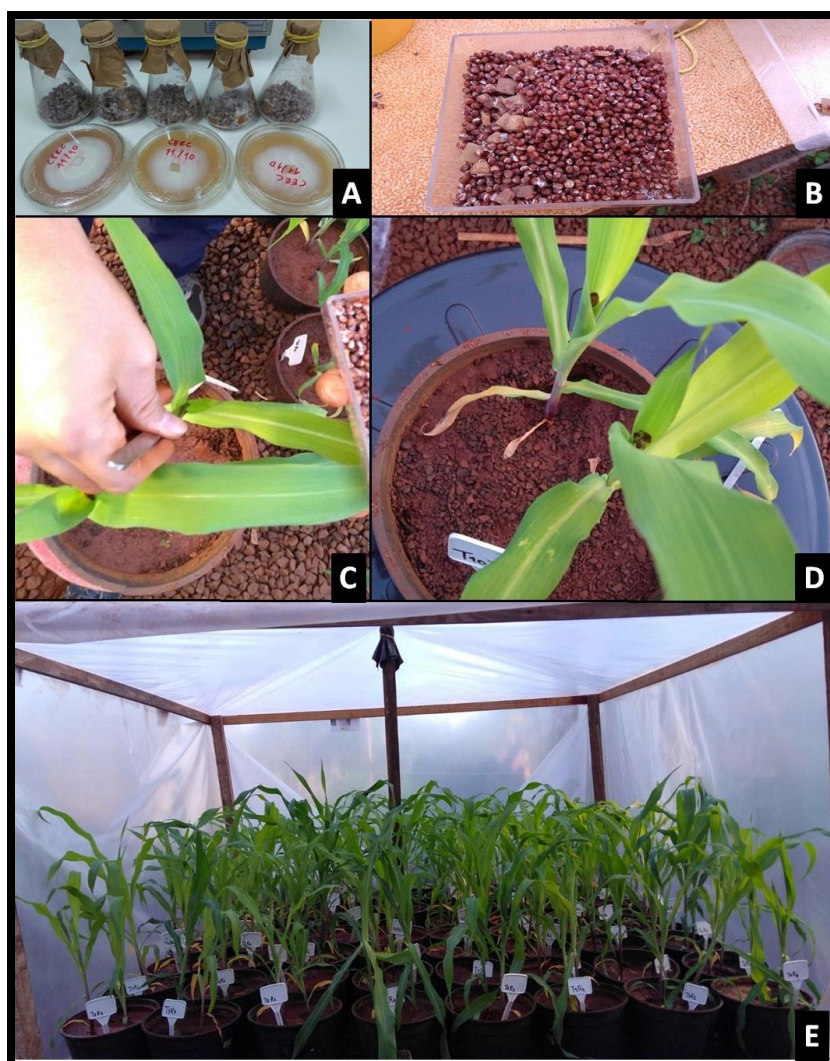


Figura 9. Inoculação de plantas de milho com *Cercospora zeae-maydis*. A- Erlenmeyers de 125 mL com grãos de sorgo inoculados com o fungo. B- Detalhe dos grãos inoculados. C- Depósito dos grãos de sorgo no cartucho. D- 15 grãos de sorgo no cartucho da planta. E- Plantas inoculadas em câmara úmida (Posso, 2017).

3.4.4 Aplicação dos tratamentos

Posteriormente a determinação da concentração de máxima eficiência de Microgeo[®] e do Bioformulado para a indução das diferentes enzimas (conforme experimento 1), as melhores doses de Microgeo[®] e de Bioformulado encontradas (1% para ambos produtos) foram aplicadas de diferentes formas: (a), aplicação quinze dias antes da inoculação (b) aplicação única no dia da inoculação; (c) aplicação semanal e (d) aplicação quinzenal até aos 63 dias após a emergência (estágio VT) (Figura 8). Além disto, foi utilizado um tratamento que constou de plantas inoculadas com *C. zae-maydis* e sem aplicação de nenhum produto.

Assim, os tratamentos foram:

Tratamento 1 – Plantas só com patógeno

Tratamento 2 – Plantas com patógeno e aplicação semanal de Microgeo[®] a 1%

Tratamento 3 – Plantas com patógeno e aplicação quinzenal de Microgeo[®] a 1%

Tratamento 4 – Plantas com patógeno e aplicação quinzenal de Bioformulado a 1%

Tratamento 5 – Plantas com patógeno e aplicação semanal de Bioformulado a 1%

Tratamento 6 – Plantas tratadas com Bioformulado a 1% quinze dias antes da inoculação

Tratamento 7 – Plantas com patógeno com aplicação única de Microgeo[®] a 1%

Tratamento 8 – Plantas tratadas com Microgeo[®] a 1% quinze dias antes da inoculação

Tratamento 9 – Plantas com patógeno com aplicação única de Bioformulado a 1%.

3.4.5 Avaliação da severidade de Cercosporiose

A avaliação de severidade foi feita a cada seis dias, totalizando seis avaliações, de maneira que a primeira avaliação foi efetuada aos 30 dias após a inoculação, quando apareceram os primeiros sintomas. A avaliação foi realizada utilizando-se percentagens de severidade para avaliar o progresso da doença nos diferentes tratamentos. Para isto folhas com diferentes percentagens de severidade foram utilizadas para realizar uma escala diagramática similar à descrita em Brunelli (2004), com modificações (Figura, 10).

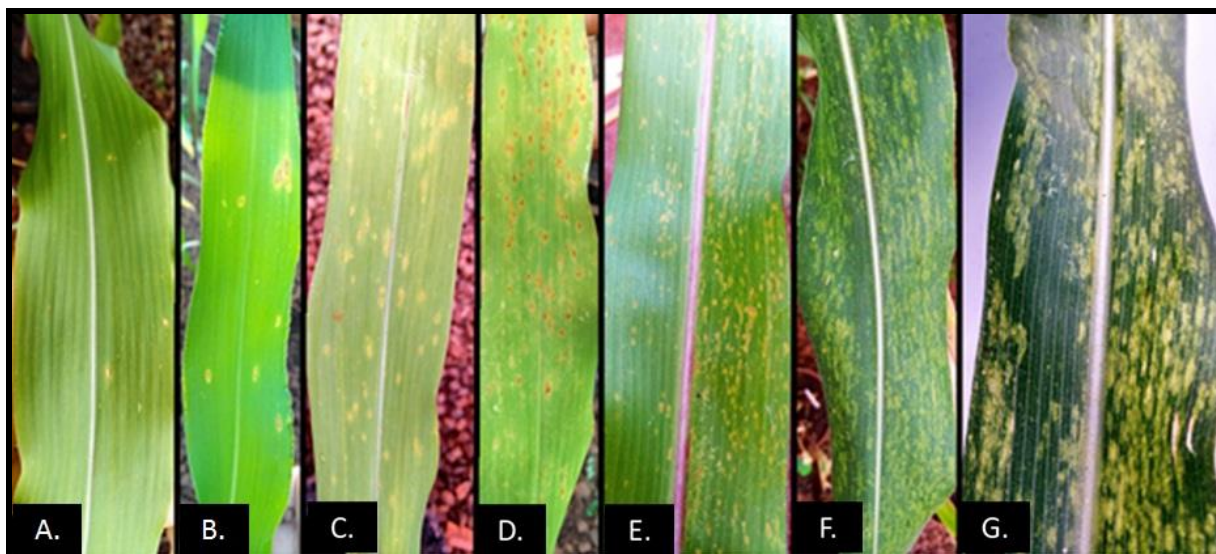


Figura 10. Escala diagramática da *Cercospora zeae-maydis* : **A)** folhas com entre 0 e 1% de lesões cloróticas; **B)** folhas com entre 1 e 5% de lesões cloróticas; **C)** folhas com entre 5 e 10% de lesões cloróticas; **D)** folhas com entre 10 e 15% de lesões cloróticas; **E)** folhas com entre 15 e 20 % de lesões cloróticas; **F)** folhas com entre 20 e 25% de lesões cloróticas; **G)** folhas com entre 25 e 30% de lesões cloróticas (Posso, 2017).

A partir dos dados de severidade foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), de acordo com Campbell e Madden (1990), empregando a formula:

$AACPD = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 * (t_{i+1} - t_i)$, onde: n = número de avaliações; y = severidade de Cercosporiose (%); t = tempo (dias). Além disto calculou-se a taxa de progresso da doença (r) (CAMPBELL e MADDEN, 1990), baseado na fórmula $r = (1/T) * \ln(X/x_0)$; onde: T = tempo decorrente entre a primeira e última avaliação (dias); ln = logaritmo natural; X = severidade da doença da última avaliação (%); x_0 = severidade da doença na primeira avaliação (%).

3.4.6 Teor de clorofila a, b e total

Aos 63 dias após emergência (estágio VT) (Figura 8), foi realizada a quantificação de clorofila a e b. Para isto, discos de folhas com aproximadamente 10 mm de diâmetro foram retirados das plantas para a quantificação dos teores de clorofila. A metodologia utilizada foi a de Arnon (1949) com adaptações. As amostras de tecido vegetal foram pesadas e acondicionadas em frascos de vidro âmbar contendo 10 mL de acetona 80%, durante sete dias no escuro a 25°C (Figura 11). Ao fim deste período, realizou-se leitura em espectrofotômetro a 663 nm e 645 nm para clorofila a e b, respectivamente. A determinação do teor de clorofila a foi calculada pela fórmula $(0,0127.A_{663}) - (0,00269.A_{645})$ e clorofila b pela fórmula

(0,0229.A645)-(0,00468.A663). O teor de clorofila total foi obtido pela soma dos resultados dos conteúdos de clorofila *a* e *b*. Os valores foram expressos em mg.g^{-1} tecido fresco.

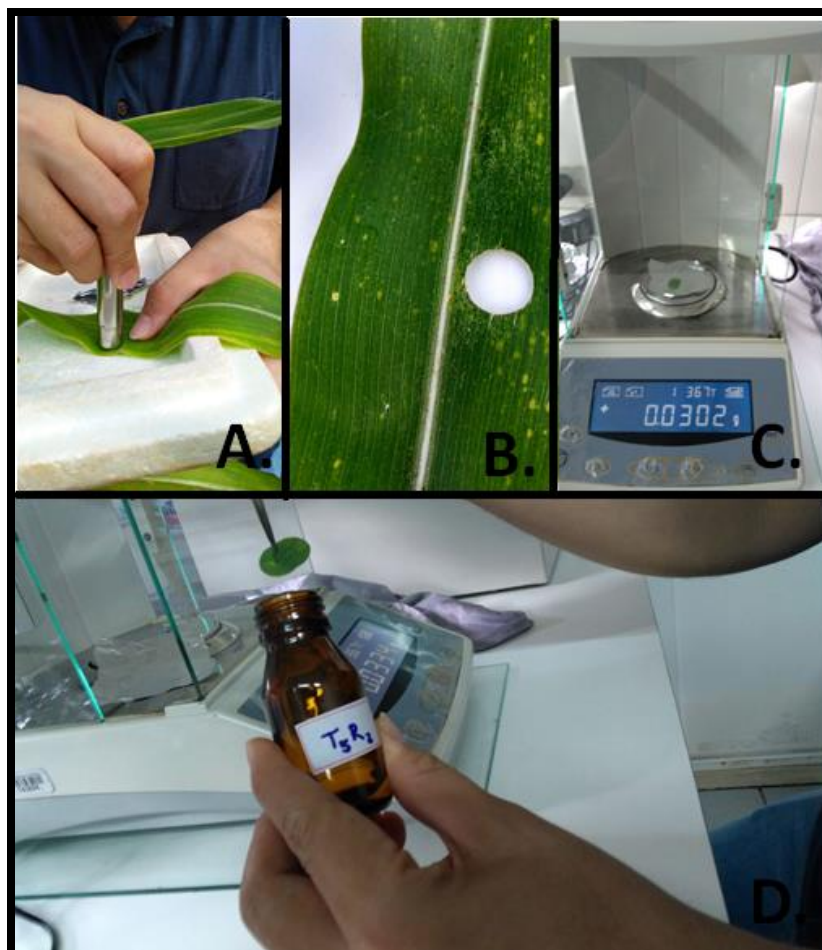


Figura 11. Amostras para clorofila *a* e *b* de plantas de milho. **A** e **B**- Retirada de discos foliares de 10 mm. **C**- Pesagem dos discos foliares. **D**- Depósito dos discos foliares em frascos âmbar com 5 mL de acetona (Posso, 2016).

3.4.7 Biometria

Para a avaliação biométrica foi determinada as variáveis comprimento (cm) e diâmetro do caule (cm), peso fresco (gramas) e seco das plantas (gramas). O comprimento da haste foi medido com cinta métrica desde a base da haste até o cartucho. A variável diâmetro do caule, foi determinada com auxílio de paquímetro digital a 50 cm da base das plantas. O peso fresco do caule e folhas foi determinado com balança de precisão. Posteriormente pesadas as plantas utilizadas no teste de peso fresco foram acondicionadas em sacos de papel e secadas em estufa de circulação a 75°C por quatro dias, ao fim de determinar o peso seco em balança de precisão.

3.5 Delineamento experimental e análise de dados

Utilizando-se como unidade experimental um vaso de 10 L com duas plantas de milho pipoca, o delineamento experimental utilizado foi completamente ao acaso, com 10 tratamentos e seis repetições. Foram atendidos os pressupostos da homogeneidade das variâncias e a distribuição dos dados, sendo determinados pelo teste Levene, e o método Shapiro-Wilk respectivamente. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ($p < 0.05$) pelo teste F e quando significativa as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, através do programa de análise estatística e planejamento de experimentos SISVAR 5.6.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1: Produtos naturais fermentados: ativação de mecanismos de defesa em milho pipoca

4.1.1 Ativação de PRP's mediante a aplicação de Microgeo® nas diferentes concentrações e tempos de coleta

4.1.2 Catalase

Para a atividade específica da catalase pode-se observar pelo desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas, que a regressão foi significativa com ajuste para o modelo cúbico (Figura 12). Nas primeiras 24 horas, na concentração 3,7% do Microgeo®, observou-se três vezes mais atividade da enzima catalase ($44,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), quando comparado ao tratamento com água (Figura 12A). No tempo das 48 horas, porém a máxima atividade da enzima foi observada na concentração 1,87% com $51 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, por tanto 2,5 vezes a mais que o tratamento água (Figura 12B). No horário 72 horas a máxima atividade enzimática foi observada na concentração 4,5% com $63 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, valor 3,3 vezes maior que o tratamento com água (Figura 12C). Na coleta de 96 horas, após a aplicação na concentração de 3,9% de Microgeo®, observou-se uma atividade superior de catalase de $56 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, resultado 2,6 vezes superior ao tratamento água (Figura 12D). No horário 120 horas observou-se $64 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína na concentração 4,3%, valor 4 vezes a mais que o tratamento controle (Figura 12E).

Na Tabela 2, pode se observar que em todas as concentrações de Microgeo®, exceto a 0%, induziram a atividade específica da catalase. Às 72 horas após a aplicação das concentrações 0,5; 1; 1,5% e 3% houve o maior incremento da atividade da enzima, ao passo que na concentração de 5% houve um aumento da atividade 120 horas após a aplicação.

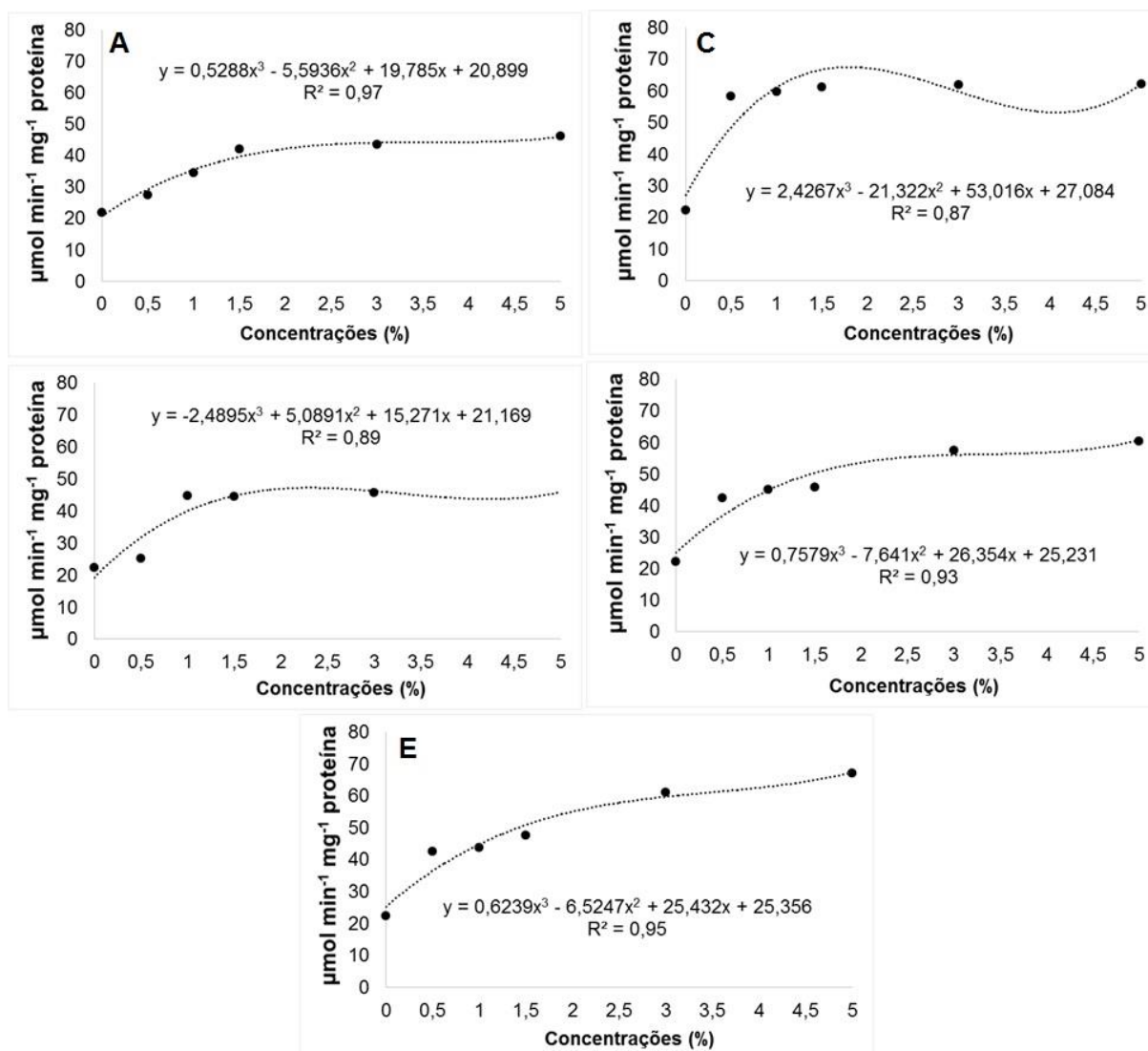


Figura 12- Atividade específica de catalase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=3,45%.

Tabela 2 – Atividade específica de catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo®.

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	22,03 a	27,59 c	34,51 c	42,23 d	43,48 c	46,19 c
48	22,26 a	25,26 c	44,67 c	44,65 cd	45,19 c	45,94 c
72	22,40 a	58,45 a	59,75 a	61,24 a	61,90 a	62,13 b
96	22,42 a	42,44 b	44,97 a	45,69 bc	57,51 b	60,50 b
120	22,52 a	42,45 b	43,82 b	47,69 c	61,05 a	67,20 a
CV %	3,45					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.1.3 Peroxidase de guaiacol

Na atividade específica de peroxidase, pode-se observar pelo desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas, que o modelo de regressão foi significativo com ajuste cúbico (Figura 13). Na concentração de 2,4% do Microgeo[®], observou-se 1,6 vezes a mais atividade da enzima peroxidase ($23,24 \text{ ABS min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$), quando comparado ao tratamento com água 24 horas (Figura 13A). No horário das 48 horas, a máxima atividade da peroxidase foi observada na concentração 1,7% com $22,97 \text{ ABS min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$, valor 1,1 vezes maior que o tratamento com água (Figura 13B). No horário 72 horas, a máxima atividade enzimática foi observada na concentração de 1,7% com $47,68 \text{ ABS min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$, valor 1,6 vezes maior que o tratamento com água (Figura 13C). Na concentração de 3%, observou-se uma atividade enzimática de $34 \text{ ABS min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$, valor 1,6 vezes maior que o tratamento com água (Figura 13D). No horário das 120 horas observou-se $46,84 \text{ ABS min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ na concentração de 2,4%, valor 2,8 vezes superior ao tratamento controle (Figura 13E).

Na Tabela 3 pode se observar que em todas as concentrações do Microgeo[®], exceto 0%, induziu a atividade específica da peroxidase. 72 horas após a aplicação das concentrações 0,5; 1; 1,5 e 3% houve o maior incremento da atividade da enzima e na concentração 5% houve um aumento da atividade 120 horas após a aplicação.

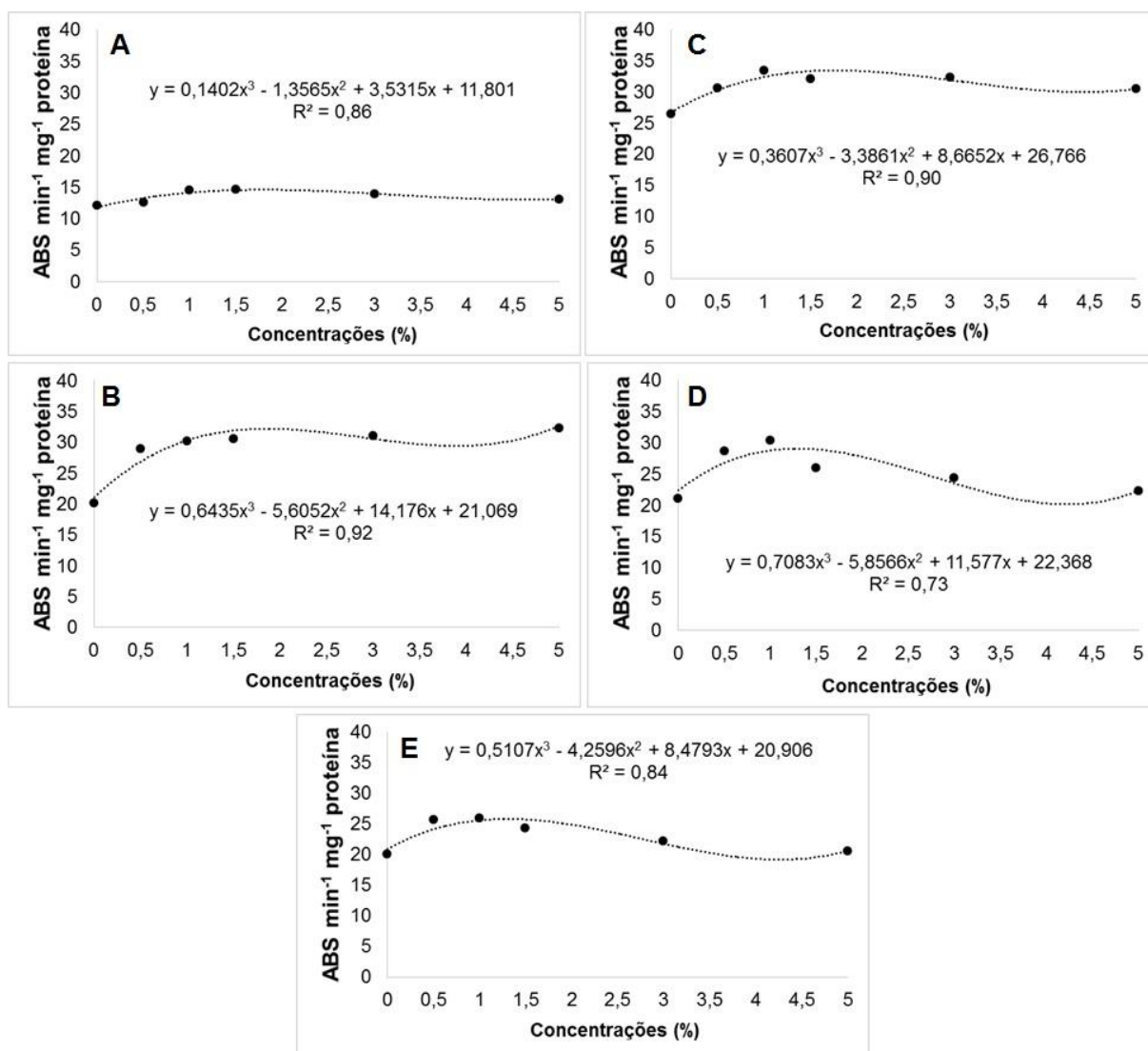


Figura 13 – Atividade específica de peroxidase de guaiacol em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=7%.

Tabela 3 - Atividade específica de peroxidase de guaiacol (ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo®.

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	14,40 d	16,02 c	21,60 d	22,65 c	22,75 c	23,02 c
48	19,92 bc	22,35 b	22,40 cd	22,70 bc	22,78 c	23,43 c
72	29,42 a	44,58 a	44,55 a	44,98 a	44,96 a	42,71 b
96	21,95 b	23,83 b	25,94 c	33,14 b	33,20 b	39,41 b
120	16,25 cd	23,60 b	31,98 b	45,06 a	49,21 a	82,69 a
CV %	7					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.1.4 Polifenoloxidase

O desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas foi significativo para modelo regressão cúbico ao analisar a polifenoloxidase (Figura 14). Na concentração 1,8% do Microgeo[®], observou-se 1,3 vezes mais atividade da enzima polifenoloxidase (3,4 Unit. min⁻¹ mg⁻¹ proteína), quando comparado ao tratamento com água 24 horas (Figura 14A). No horário das 48 horas, a máxima atividade da polifenoloxidase foi observada na concentração de 4,2% com 3,6 Unit. min⁻¹ mg⁻¹ proteína, valor 1,1 vezes maior que o tratamento com água (Figura 14B). No horário de 72 horas a máxima atividade enzimática foi observada na concentração de 1,7% com 9,3 Unit. min⁻¹ mg⁻¹ proteína, valor 2,5 vezes superior ao tratamento com água (Figura 14C). Na concentração 3% observou-se uma atividade enzimática de 4,2 Unit. min⁻¹ mg⁻¹ proteína, valor 1,2 vezes superior que ao tratamento com água (Figura 14D). No horário de 120 horas observou-se 4,53 Unit. min⁻¹ mg⁻¹ proteína na concentração 5%, valor 1,2 vezes maior que o tratamento controle (Figura 14E).

Em todas as concentrações do Microgeo[®], exceto 0%, induziram a atividade específica da polifenoloxidase (Tabela 4). Nas 72 horas após a aplicação das concentrações de 0,5%; 1%; 1,5% e 3% houve o maior incremento da atividade da enzima, ao passo que na concentração 5% houve um aumento da atividade 120 horas após a aplicação.

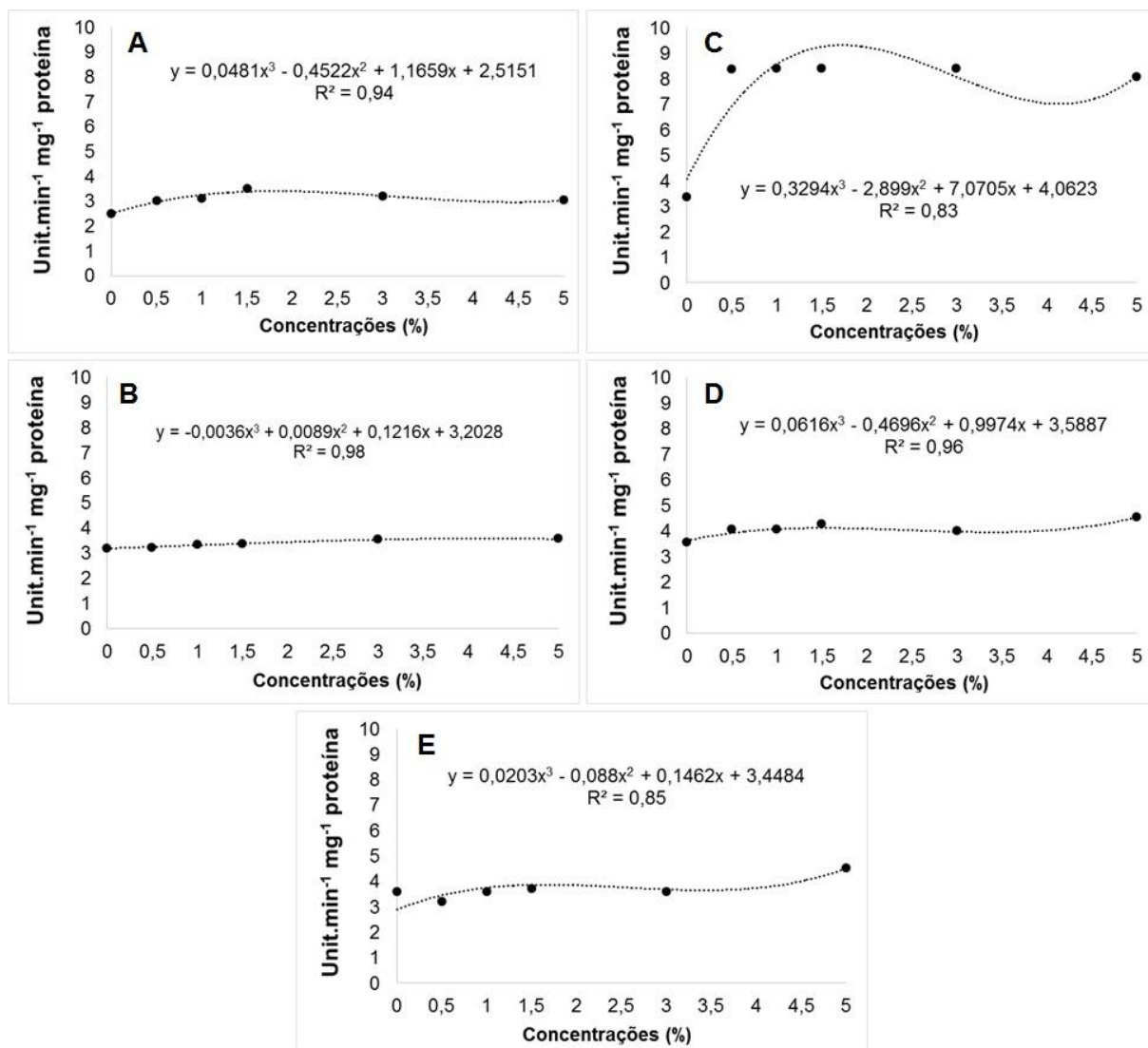


Figura 14 – Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Microgeo® dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=7%.

Tabela 4 - Atividade específica de polifenoloxidase (Unit.min⁻¹.mg⁻¹.proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo®

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	2,52 b	3,03 c	3,14 c	3,52 b	3,22 b	3,05 c
48	3,21 ab	3,24 bc	3,36 bc	3,38 b	3,55 b	3,58 c
72	3,37 ab	8,36 a	8,39 a	8,40 a	8,40 a	8,07 a
96	3,56 a	4,07 b	4,08 b	4,27 b	4,02 b	4,54 b
120	3,05 a	3,20 bc	3,58 bc	4,22 b	3,58 b	4,53 b
CV %	10,83					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.1.5 β 1,3-glucanase

O desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas foi significativo para o modelo de regressão cúbico ao analisar a β 1,3-glucanase (Figura 15). Na concentração de 1,8% do Microgeo[®], observou-se 1,3 vezes mais atividade da enzima glucanase (3,4 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína), quando comparado ao tratamento com água 24 horas (Figura 15A). No horário das 48 horas, a máxima atividade da glucanase foi observada na concentração de 4,2% com 3,6 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína, resultado 1,1 vezes maior que o tratamento com água (Figura 15B). No horário das 72 horas, a máxima atividade enzimática foi observada na concentração de 1,7% com 9,3 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína, valor 2,5 vezes superior ao tratamento com água (Figura 15C). Na concentração 3% observou-se uma atividade enzimática de 4,2 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína, valor 1,2 vezes maior que o tratamento com água (Figura 15D). No horário 120 horas, observou-se 4,53 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína na concentração de 5%, medida 1,2 vezes maior que o tratamento controle (Figura 15E).

Microgeo[®] em todas as concentrações exceto 0%, induziram a atividade específica da glucanase, com um pico de atividade 72 horas após a aplicação das concentrações 0,5%, 1%, 1,5%, 3% e 5%, e outro 120 horas após a aplicação (Tabela 5).

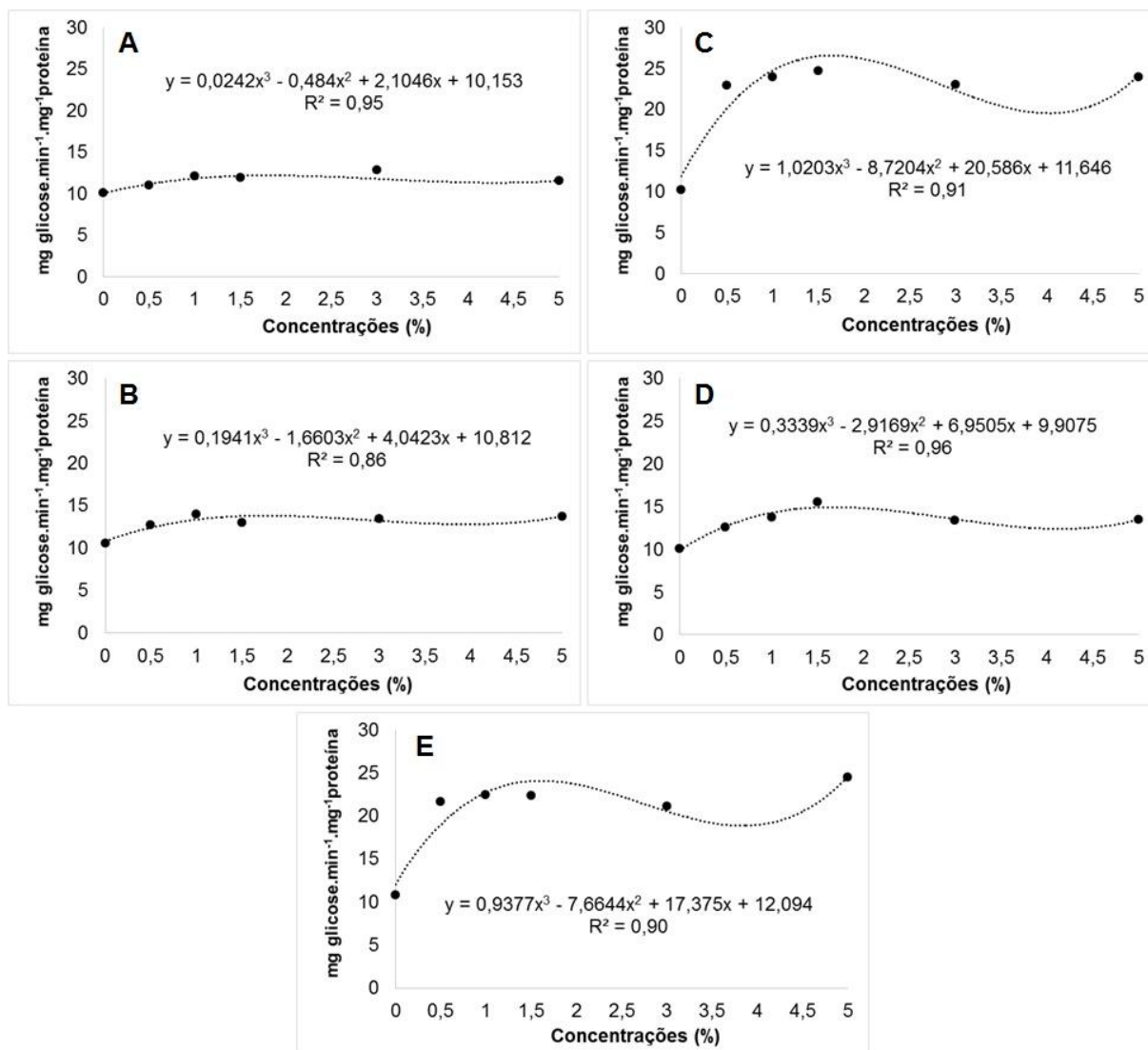


Figura 15 – Atividade específica de β 1,3-glucanase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Microgeo[®] dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120 h (E); CV=7%.

Tabela 5 - Atividade específica de β 1,3-glucanase (mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Microgeo[®].

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	10,11 a	11,05 b	12,14 b	11,98 c	11,83 b	11,59 b
48	10,58 a	12,70 b	13,97 b	13,02 bc	13,43 b	13,75 b
72	10,22 a	23,94 a	23,97 a	24,74 a	23,11 a	24,02 a
96	10,06 a	12,57 b	13,77 b	15,50 b	13,38 b	13,50 b
120	10,8 a	21,66 a	22,49 a	22,42 a	21,17 a	24,48 a
CV %	7					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.2 Ativação das PRP's mediante a aplicação de Bioformulado nas diferentes concentrações e tempos de coletas

4.2.1 Catalase

Na atividade específica da catalase pode-se analisar pelo desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas que o modelo polinomial de regressão cubica foi significativo (Figura 16). Pode-se observar que às 24 horas na concentração de 1,12% de Bioformulado, obteve-se a máxima atividade enzimática de catalase ($53,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), sendo superior ($2,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) ao tratamento com água (Figura 16A). Para as 48 horas a máxima atividade da catalase foi atingida na concentração de 1,25% de Bioformulado ($52,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína), que foi maior que o tratamento com água por $1,28 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Figura 16B). A maior atividade enzimática da catalase às 72 horas ($86,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi encontrada na concentração de 1,5% de Bioformulado, a qual foi superior ao tratamento com água por $34,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína (Figura 16C). A atividade enzimática de catalase às 96 horas foi superior com 2,0% do Bioformulado, observando-se uma atividade enzimática de $124 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, valor 2 vezes maior que aquele do tratamento com água (Figura 16D). No horário das 120 horas, observou-se que a maior atividade de catalase ($69,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) foi atingida com 2,6% de Bioformulado, que foi superior $22,6 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína, em relação ao controle (Figura 16E).

Todas as concentrações de Bioformulado apresentaram atividade específica da catalase (Tabela 6), de maneira que às 96 horas obtiveram-se as maiores atividades de catalase, na concentração de 1,5% de Bioformulado.

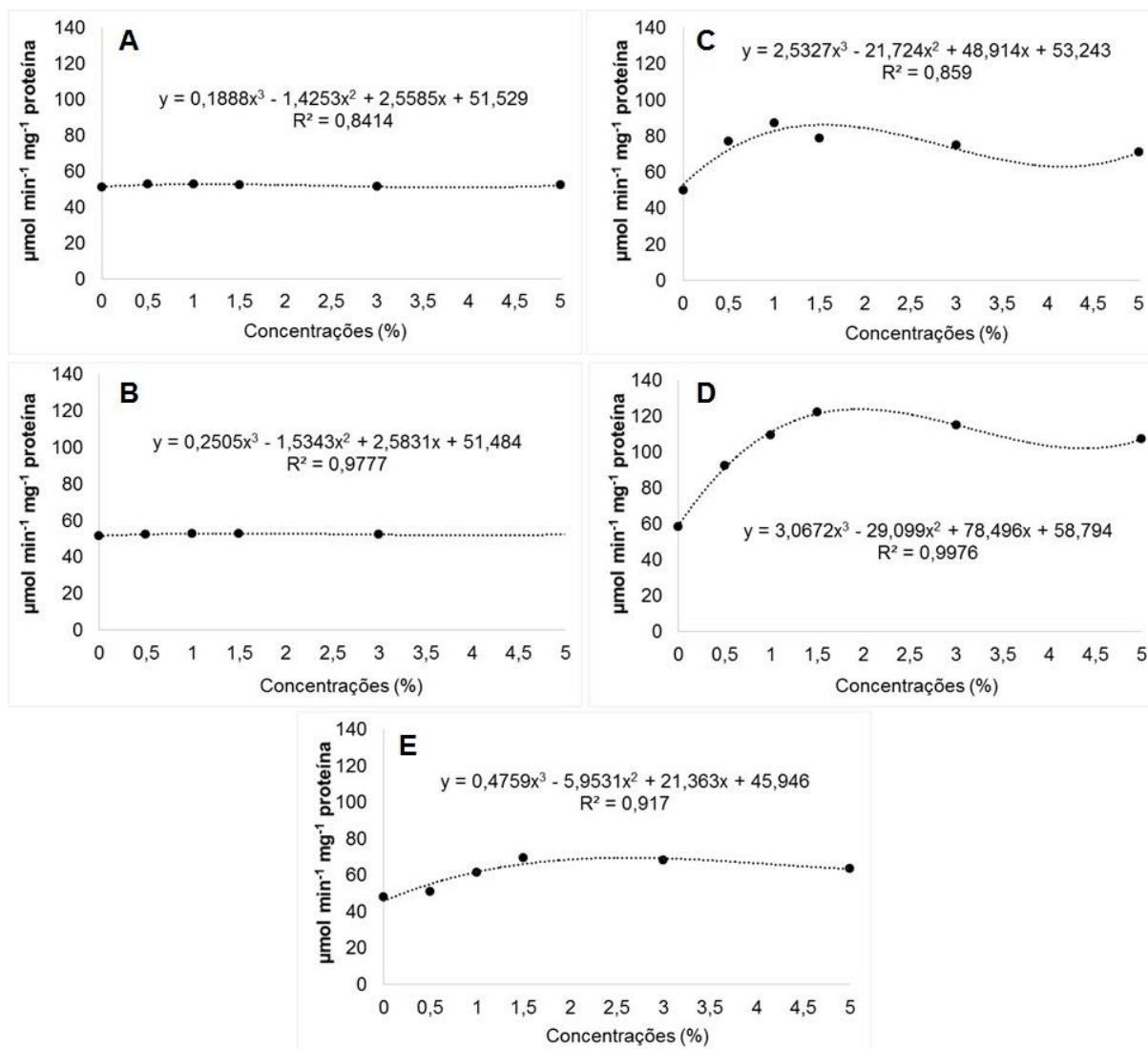


Figura 16 – Atividade específica de catalase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120h (E); CV=1,20%.

Tabela 6 – Atividade específica de catalase ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	51,31 b	52,92 c	52,83 d	52,50 d	51,58 d	52,27 d
48	51,51 b	52,33 cd	52,90 d	52,70 d	52,19 d	52,31 d
72	50,21 b	77,14 b	87,22 b	78,71 b	74,94 b	71,03 b
96	58,53 a	92,36 a	109,34 a	122,50 a	115,08 a	107,21 a
120	48,02 c	51,21 d	61,38 c	69,51 c	68,21 c	63,58 c
CV %	1,20					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.2.2 Peroxidase de guaiacol

Para o desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas, para a atividade específica de peroxidase, o modelo de regressão cúbica foi significativo (Figura 17). A maior atividade de peroxidase às 24 horas foi constatada com 1,8% de Bioformulado (14,6 24 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína), superando em 9,9 24 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína, o tratamento com água (Figura 17A). Na coleta das 48 horas, a máxima atividade da peroxidase (32,2 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi encontrada na concentração 1,9% de Bioformulado, perfazendo um valor de 0,6 24 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína a mais que o controle (Figura 17B). Contudo, para o horário das 72 horas o pico de atividade da peroxidase (33,5 24 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi observado na concentração de 1,8% de Bioformulado, valor superior ao controle em 6,924 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Figura 17C). Para a colheita das 96 horas, a maior atividade de peroxidase (29.1 24 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi atingida na concentração de 1,3% de Bioformulado, que superou o tratamento com água por 7,3 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Figura 17D). Para o horário das 120 horas a máxima atividade de peroxidase (25,8 24 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi encontrada na concentração de 1,3% de Bioformulado, que foi superior que o controle em 5,3 ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Figura 17E).

Após 24 horas da aplicação das diferentes concentrações de Bioformulado, registrou-se as menores atividades de peroxidase (Tabela 7). No entanto, as maiores atividades desta enzima foram observadas às 72 horas nas diferentes concentrações, principalmente, na concentração de 1% de Bioformulado.

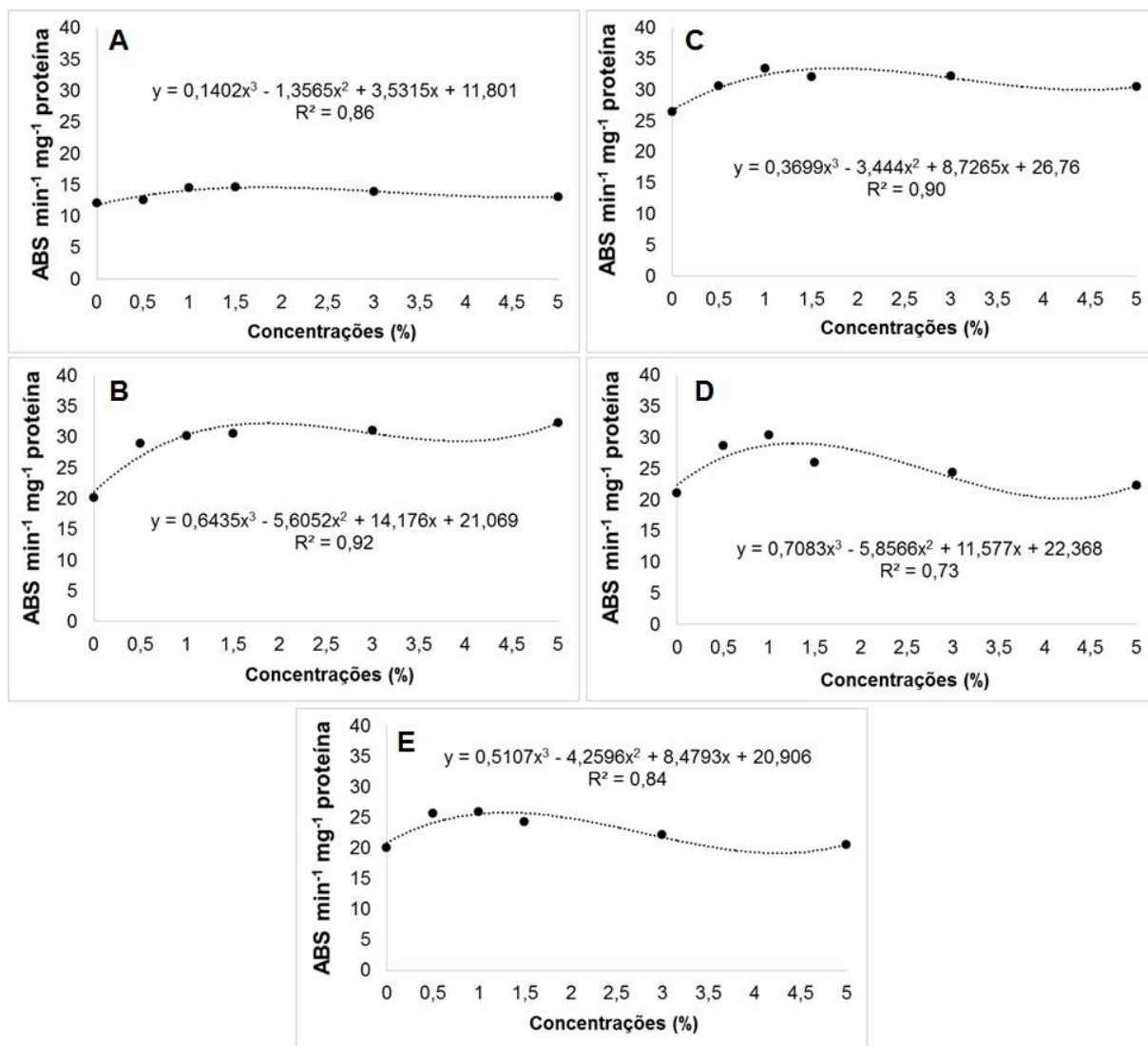


Figura 17 – Atividade específica de peroxidase de guaiacol em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (**A**), 48h (**B**), 72h (**C**), 96h (**D**) e 120h (**E**); CV =6,12%.

Tabela 7 - Atividade específica de peroxidase de guaiacol (ABS min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	12,09 c	12,53 c	14,50 d	14,64 c	13,88 c	13,09 c
48	20,04 b	28,95 a	30,13 b	30,54 a	31,02 a	32,19 a
72	26,43 a	30,61 a	33,42 a	32,11 a	32,23 a	30,49 a
96	21,12 b	28,71 a	30,39 b	25,95 b	24,35 b	22,26 b
120	20,09 b	25,65 b	25,98 c	24,34 b	22,53 b	20,59 b
CV %	6,12					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.2.3 Polifenoloxidase

Para a atividade da enzima polifenoloxidase, o desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas foi significativo para modelo de regressão cúbica (Figura 18). A maior atividade de polifenoloxidase às 24 horas ($2,9 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) encontrou-se na concentração de 1,8% de Bioformulado, a qual superou o controle com $0,9 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ (Figura 18A). Para a colheita das 48 horas, verificou-se que a maior atividade de polifenoloxidase ($7,3 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$) encontrou-se concentração de 4,3% de Bioformulado, que foi duas vezes maior que o tratamento com água (Figura 18B). Na coleta das 72 horas (Figura 18C), o máximo acumulado de polifenoloxidase, foi evidenciado com 1% de Bioformulado. A máxima atividade enzimática de polifenoloxidase às 96 horas esteve com $6,7 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$, a qual foi atingida na concentração de 0,8% de Bioformulado, que superou o controle em $1,5 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$ (Figura 18D). Com uma concentração de 1,3% de Bioformulado às 120 horas, atingiu-se a maior atividade de polifenoloxidase ($7,6 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$), que excedeu em $2,2 \text{ Unit min}^{-1} \text{ mg}^{-1} \text{ proteína}$, comparativamente ao controle (Figura 18E).

Pode-se inferir que as atividades inferiores de polifenoloxidase foram atingidas às 24 horas nas diferentes concentrações de Bioformulado (Tabela 8), as quais foram inferiores, inclusive, ao tratamento com água. Por outro lado, as maiores atividades de polifenoloxidase foram observadas 72 horas após aplicação, com atividade superior na concentração de 0,5% de Bioformulado.

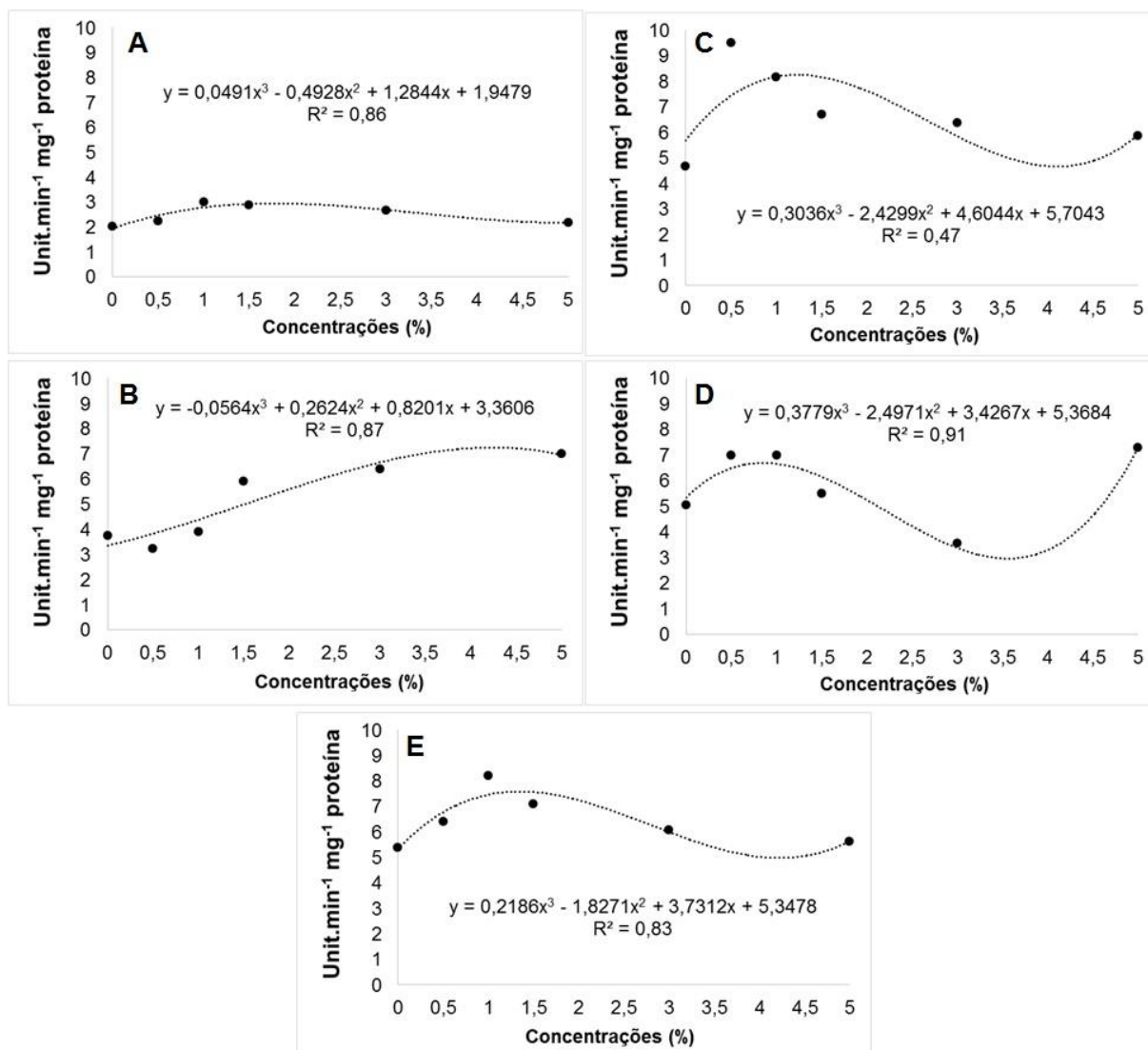


Figura 18 – Atividade específica de polifenoloxidase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (A), 48h (B), 72h (C), 96h (D) e 120h (E); CV=8,66%.

Tabela 8 - Atividade específica de polifenoloxidase (Unit min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	2,03 c	2,23 d	3,01 c	2,88 d	2,68 b	2,19 c
48	3,75 b	3,22 c	3,91 c	5,91 bc	6,40 a	7,00 a
72	4,67 a	9,51 a	8,17 a	6,70 ba	6,36 a	5,85 b
96	5,07 a	6,99 b	6,99 b	5,50 c	3,57 b	7,29 a
120	5,40 a	6,42 b	8,20 a	7,09 a	6,07 a	5,64 b
CV %	8,66					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

4.2.4 β 1,3-glucanase

Na análise da atividade de β 1,3-glucanase, o desdobramento das concentrações dentro dos horários de coletas foi significativo para o modelo de regressão cúbica (Figura 19). No horário das 24 horas a maior concentração de β 1,3-glucanase (19,45 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi observada com 5% de Bioformulado, proporcionando 9,6 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína a mais que o controle (Figura 19A). Para a colheita das 48 horas, a maior atividade de β 1,3-glucanase (10,68 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi registrada na concentração de 0,8% de Bioformulado, com 0,4 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína a mais que o tratamento com água (Figura 19B). No horário das 72 horas, a maior atividade de β 1,3-glucanase (23,89 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) apresentou-se com 2,9% de Bioformulado, que foi superior em 13,8 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína, comparativamente ao controle (Figura 19C). Na colheita das 96 horas a maior atividade de β 1,3-glucanase (16,55 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi observada usando-se 3,6% de Bioformulado, que superou o controle com 6,4 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína a mais (Figura 19D). Finalmente, às 120 horas a maior atividade de β 1,3-glucanase (24,9 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) foi atingida com uma concentração de 1,4% de Bioformulado, que superou ao controle com 1,7 mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína (Figura 19E).

As atividades de β 1,3-glucanase significativamente superiores foram observadas 120 horas após da aplicação do Bioformulado (Tabela 9), no entanto apresentarem diferenças significativas entre as diferentes concentrações neste mesmo horário. As menores atividades de β 1,3-glucanase foram observadas 48 horas após aplicação do Bioformulado, sendo que a menor atividade registrada foi com as concentrações de 1% e 5% de Bioformulado.

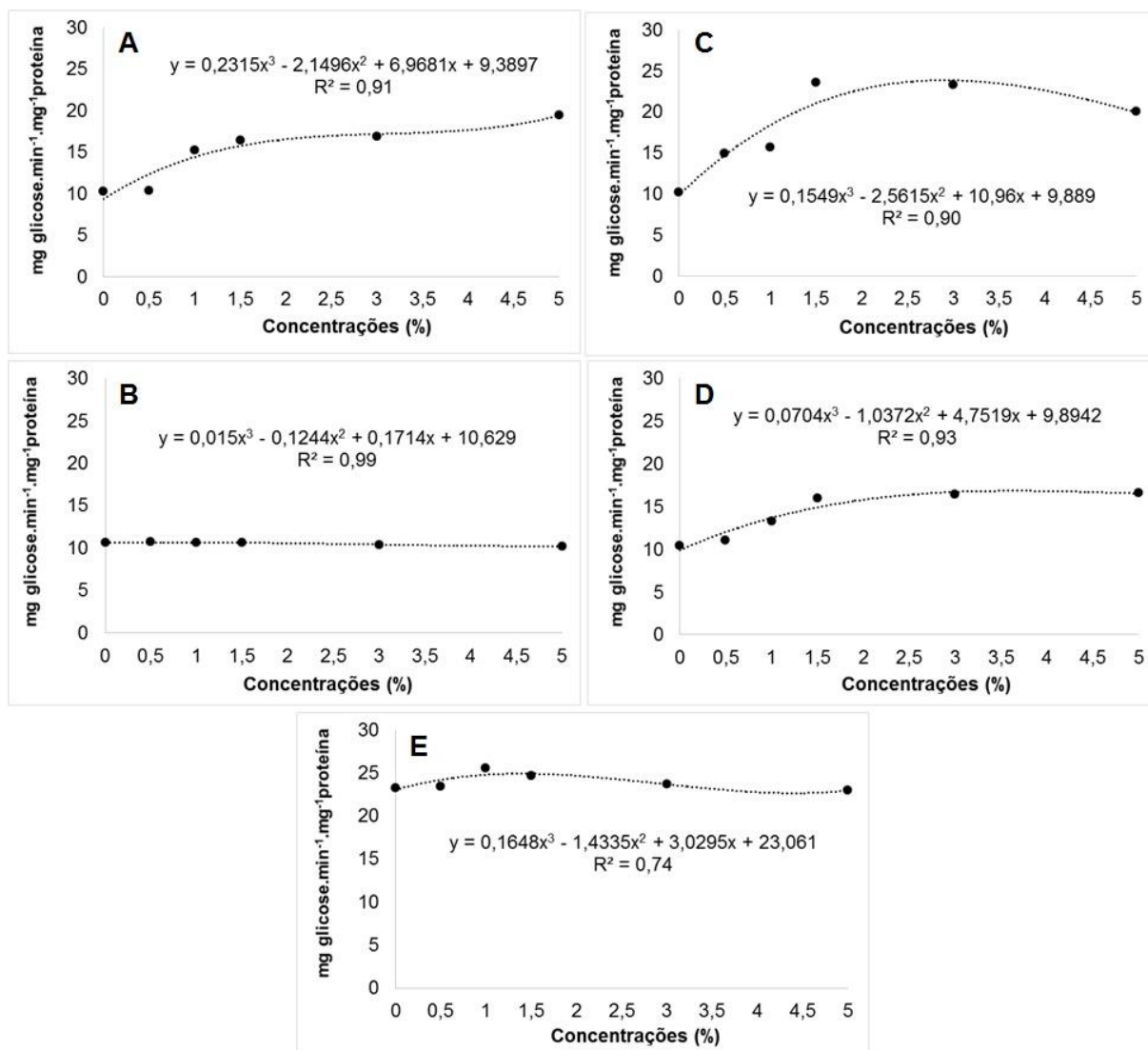


Figura 19 – Atividade específica de β 1,3-glucanase em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre as diferentes concentrações de Bioformulado dentro dos seguintes tempos de coleta: 24h (**A**), 48h (**B**), 72h (**C**), 96h (**D**) e 120h (**E**); CV=4,36%.

Tabela 9 - Atividade específica de β 1,3-glucanase (mg glicose min⁻¹ mg⁻¹ proteína) em plantas de milho pipoca em função do desdobramento da interação entre horários de coletas dentro das concentrações de Bioformulado.

Horários (horas)	Concentrações (%)					
	0	0,5	1	1,5	3	5
24	10,26 b	10,34 c	15,24 b	16,42 b	16,87 b	19,48 b
48	10,62 b	10,71 c	10,67 d	10,66 c	10,43 c	10,25 d
72	10,23 b	15,02 b	15,76 b	23,62 a	23,37 a	20,08 b
96	10,44 b	11,07 c	13,28 c	16,01 b	16,39 b	16,57 c
120	23,30 a	23,49 a	25,58 a	24,70 a	23,68 a	22,98 a
CV %	4,36					

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

É importante observar que o aumento inicial da atividade das enzimas catalase, peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3glucanase iniciou-se 24 horas após a aplicação do Microgeo® e do Bioformulado, principalmente nas doses de 1 e 1,5%, de maneira que a mais intensa atividade enzimática foi observada entre 72 e 96 horas após da aplicação dos tratamentos.

Na atividade da enzima peroxidase, observa-se que a atividade enzimática iniciou-se 24 horas após as plantas serem tratadas, sendo as maiores atividades registradas entre às 48 e 72 horas. No entanto, também se observou atividade de peroxidase nas plantas não tratadas. Resultados similares obtiveram Cadena-Gomez e Nicholson (1987), que observaram que a atividade da peroxidase iniciou 12 horas após a inoculação de plantas de milho com *Helminthosporium maydis* ou *Colletotrichum graminicola*, de maneira que os maiores registros da atividade desta enzima foram observados 36 horas após à inoculação. Contudo, os autores também reportaram atividade de peroxidase nas plantas não inoculadas. Outros autores como Salvador-Figueroa e Pérez-Flores (2013) analisando a dinâmica da enzima peroxidase em plantas de milho inoculadas com bactérias diazotróficas e submetidas a estresse hídrico, reportaram um incremento da enzima conforme aumenta o estresse hídrico, tendo estas plantas atividade de peroxidase 1,5 vezes mais que as plantas não inoculadas.

A atividade da catalase foi observada no início da atividade, ou seja, 24 horas após o tratamento das plantas com o Microgeo® ou o Bioformulado, com as maiores atividades registradas às 72 e 96 horas nas concentrações 1% e 1,5 % para ambos os produtos. Tais resultados corroboram Sytykiewicz (2015), que encontrou alterações significativas nas respostas de transcrição de genes de catalase em diferentes híbridos de milho quando foram expostas a herbivoria por afídeos. Outros estudos como o de Lanubile et al. (2012), que estudaram a expressão constitutiva de proteínas relacionadas a patogêneses e a atividade enzimática de milho na resistência de *Fusarium verticilloides*, encontraram que as espigas inoculadas se protegeram contra o estresse oxidativo e contra o ataque do patógeno mediante a expressão de genes relacionados a patogênese e induzindo maior atividade enzimática de catalase. Resultados similares foram obtidos por Erdal (2012), que estudando as alterações moleculares e fisiológicas em milho por pulverizações foliares de androsterone ($C_{19}H_{30}O_2$), encontraram que a aplicação deste indutor diminui significativamente a lesão produzida pelo estresse ao frio, fato este, que é associado a uma maior atividade da enzima catalase. Talaat et al. (2015), também encontraram um aumento significativo da atividade de catalase em plantas

de milho quando se usou como indutores o 24-epibrassinolide (24-EBL) e o Espermidina (SPM).

O primeiro pico da atividade de polifenoloxidase foi observado nas primeiras 24 horas após os tratamentos das plantas, de maneira que a maior atividade da enzima foi atingida 72 horas após a aplicação do Microgeo® e/ou do Bioformulado na concentração de 1,5 %. Autores como Cadena-Gomez e Nicholson (1987), mediante provas histoquímicas após a inoculação de plantas de milho encontraram presença de fenóis a partir das primeiras 12 horas após inoculação com *Helminthosporium maydis* ou *Colletotrichum graminicola*. Junqueira (2003), por exemplo, avaliando híbridos suscetíveis demonstrou que existe um aumento de 90% de fenóis em plantas inoculadas com o fitoplasma de enfezamento vermelho. Também Erdal (2012), avaliando as alterações moleculares e fisiológicas induzidas em milho por pulverizações foliares de androsterona em resposta ao frio, registrou maiores atividades na capacidade antioxidante total nas plantas de milho.

Quanto a atividade de β -1,3 glucanase, observa-se que esta atividade iniciou 24 horas após o tratamento das plantas, porém com um maior pico de atividade às 120 horas, quando se utilizaram doses entre 1% e 1,5% de Microgeo® e Bioformulado respectivamente.

4.2.5 Produção de gliceolinas em soja

Os bioensaios com fitoalexinas gliceolinas foram utilizados como ensaios-padrão e dão indicação se o produto ativa a rota metabólica de compostos do metabolismo oxidativo e de outras fitoalexinas que nem sempre são facilmente detectáveis.

Observa-se que houve indução e acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja quando tratados com as diferentes concentrações do Microgeo® (Figura 20). Isto indica que, independente da dose utilizada, este produto é capaz de induzir fenóis e fitoalexinas. No entanto o Bioformulado não apresentou acúmulo de gliceolinas.

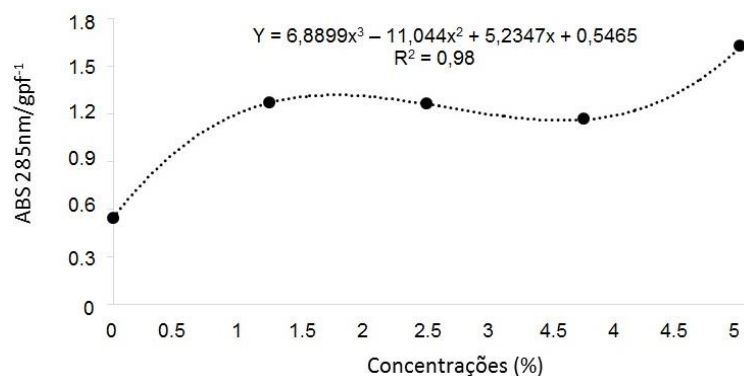


Figura 20. Acúmulo de gliceolina em cotilédones de soja BRS 184 tratados com Microgeo®

Estes resultados obtidos na indução de gliceolinas com Microgeo®, podem se apoiar no fato em que autores como Barbosa e Madeiros (2007) reportam que os biofertilizantes além de conterem substâncias indutoras de SRI e SRA em sua composição, possuem também outros semioquímicos que atuam sinergicamente, fortalecendo o sistema de autodefesa da planta, como por exemplo, as fitoalexinas. Por exemplo, (Curti, 2010) reporta que o produto alternativo elaborado com lácteo fermentado e submetido a tratamento térmico, apresenta capacidade elicitora, demonstrada pela produção de gliceolinas em cotilédones de soja.

4.3 Experimento 2: Produtos naturais fermentados: controle de Cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*) em plantas de milho pipoca tratadas com Microgeo® e Bioformulado a base de capim limão

No transcurso do experimento foram evidentes os sintomas de cercosporiose em todas as plantas, de maneira que os primeiros sintomas foram observados principalmente nas folhas baixas aos 20 dias após da inoculação com patógeno. Não foram encontradas outras doenças foliares. As lesões iniciais de *C. zeae-maydis* encontradas caracterizaram-se por serem manchas alongadas ou de formato ovalado, com coloração bronze ou marrom e bordas avermelhadas de tamanhos variável e paralelas à nervura das folhas (Figura 21).

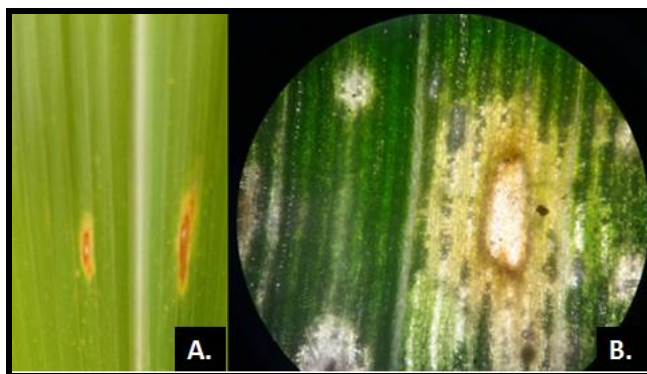


Figura 21. Lesões iniciais de Cercosporiose. A- Lesões paralelas à nervura. B- Lesão vista ao microscópio (10X).

De maneira geral, as folhas do terço médio foram as que apresentaram maiores lesões, nestas folhas houve um comportamento diferente com respeito aos outros segmentos, os quais apresentaram menor severidade; contudo a doença depois de fixar-se nestas folhas apresentou um desenvolvimento em direção ao ápice das plantas de milho, possivelmente este fato esteja relacionado a condições favoráveis para o patógeno como são o acúmulo de água presente no cartucho das plantas, este fato também pode relacionar-se com que as plantas não tiveram ainda ativado reações de defesa nestas folhas novas permitindo ao patógeno colonizar com mais facilidade estas.

Não se observa diferenças significativas para as taxas de progresso da doença durante as avaliações (Tabela 10), sendo que a taxa de progresso nos diferentes períodos, não diferiu significativamente para nenhum dos tratamentos. No período seguinte (r2), foi observado um aumento na taxa de progresso, fato que pode ser explicado por um desenvolvimento mais rápido do patógeno nas plantas. No terceiro período foi observada uma diminuição na taxa de progresso (r3), este comportamento pode relacionar-se a uma possível ativação do arsenal enzimático das plantas como uma reação ao ataque do patógeno ou como ativação pela reação aos tratamentos objeto de estudo, este comportamento foi similar para os seguintes períodos para a taxa de progresso (r4) e finalmente o último período (r5) que apresentou a menor taxa de progresso (Tabela 10).

Tabela 10 - Taxa de progresso de Cerosporiose em plantas de milho pipoca com os diferentes tratamentos

¹ Tratamento	r1	r2	r3	r4	r5
1	0,14 a	0,17 a	0,08 a	0,09 a	0,09 a
2	0,16 a	0,18 a	0,09 a	0,09 a	0,08 a
3	0,15 a	0,18 a	0,09 a	0,09 a	0,08 a
4	0,16 a	0,19 a	0,10 a	0,09 a	0,08 a
5	0,16 a	0,19 a	0,10 a	0,08 a	0,09 a
6	0,14 a	0,18 a	0,09 a	0,08 a	0,08 a
7	0,17 a	0,17 a	0,09 a	0,08 a	0,08 a
8	0,13 a	0,17 a	0,09 a	0,08 a	0,08 a
9	0,13 a	0,17 a	0,09 a	0,09 a	0,08 a
CV %	24,1	10,89	15,64	12,73	6,93

r1 – taxa de progresso da doença entre a primeira e segunda avaliação (30 - 36 dias); r2 - taxa de progresso da doença entre a segunda e terceira avaliação (36 – 42 dias); r3 - taxa de progresso da doença entre a terceira e quarta e quarta avaliação (42 – 48 dias); r4 - taxa de progresso da doença entre a quarta e quinta avaliação (48 – 54 dias); r5 – taxa de progresso da doença entre a quinta e sexta avaliação (54 e 60 dias). Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Com respeito à avaliação da AACPD total, a análise de variância não detectou diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, é dizer que a aplicação dos tratamentos com Microgeo® e Bioformulado não foram eficientes no controle da Cercosporiose, sendo que a precisão experimental avaliada pelo coeficiente de variação (CV) foi de 16,13% (Tabela 11). Contudo, de acordo com Medeiros (2002) o uso de biofertilizantes líquidos ou fermentados microbianos enriquecidos, têm sido uma das principais estratégias trofobióticas empregadas no manejo ecológico de pragas e doenças; além existem evidências que o uso de biofertilizantes e fermentados apresenta ações promotoras de crescimento e elicitoras de resistência sistêmica, induzidas na planta, bem como ações repelentes, fagodeterrente e antixenótica contra pragas e a antibiose no controle de doenças, (Bettiol et al., 1998). No entanto é importante ressaltar que autores com De Madeiros e Da Silva (2006), reportam que os biofertilizantes apresentam efeitos positivos no controle de pragas e doenças de plantas; além disto, reportaram que o biofertilizante Microgeo® reduz a fecundidade, período de ovoposição e longevidade de fêmeas do ácaro-da-leprose dos citrus *Brevipalpus phoenics*, além reportam que este biofertilizantes age sinergicamente com *Bacillus thuringiensis* e o fungo *Bauveria bassiana*, reduzindo a viabilidade de larvas do bicho-furão-dos cítrós (*Ecdytolopha auratiana*), finalmente estes autores concluíram que este biofertilizante age por contato direto e residual como também de forma sistêmica na planta.

Estes fatos evidenciam que os biofertilizantes e os bio-preparados fermentados, têm um alto potencial graças a sua composição de substâncias que afetam a reprodução e metabolismo de pragas e doenças, por isto é importante fazer novas pesquisas com produtos como o Microgeo® e o Bioformulado para o controle de doenças e pragas em diferentes culturas.

Tabela 11 – Severidade média, Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) de Cercosporiose em milho pipoca e porcentagem de controle em relação às plantas só inoculadas.

¹ Tratamento	Severidade média	AACPD
1	29,49	308,73 a
2	26,41	279,85 a
3	26,43	280,55 a
4	26,73	281,41 a
5	27,41	283,98 a
6	26,89	285,72 a
7	26,33	286,40 a
8	26,89	291,53 a
9	27,73	295,82 a
CV %	-	16,13

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

Para as análises biométricas as variáveis alturas das plantas, diâmetro do colmo, massa fresca, clorofila *a*, clorofila *b* e clorofila total não apresentaram diferenças significativas entre os diferentes tratamentos, de maneira que se pode afirmar que não existe alguma relação entre a aplicação dos produtos e o desenvolvimento destas variáveis nas plantas. Porém, o peso seco das plantas submetidas aos tratamentos 2, 3 e 4, foi significativamente superiores aos demais tratamentos (Tabela 12).

Tabela 12 – Biometria (altura, diâmetro do colmo, massa fresca, massa seca, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total, 60 dias após a semeadura de plantas de milho pipoca.

¹ Tratamentos	Altura (cm)	Diâmetro colmo (mm)	Massa fresca (g)	Massa seca (g)	Clorofila <i>a</i> (mg/g folha)	Clorofila <i>b</i> (mg/g folha)	Clorofila total (mg/g folha)
1	149,6 a	10,54 a	118,90 a	38,09 b	0,376 a	0,138 a	0,514 a
2	149,6 a	10,3 a	106,58 a	40,73 a	0,314 a	0,097 a	0,411 a
3	157,0 a	10,37 a	108,61 a	47,52 a	0,183 a	0,056 a	0,239 a
4	150,6 a	9,36 a	84,16 a	27,47 b	0,211 a	0,079 a	0,290 a
5	150,3 a	10,47 a	95,68 a	27,70 b	0,247 a	0,078 a	0,325 a
6	164,5 a	9,85 a	112,00 a	34,32 b	0,212 a	0,068 a	0,280 a
7	159,8 a	10,03 a	103,97 a	28,63 b	0,318 a	0,127 a	0,445 a
8	158,9 a	9,372 a	97,58 a	33,46 b	0,290 a	0,092 a	0,382 a
9	174,1 a	9,76 a	118,77 a	35,64 b	0,335 a	0,111 a	0,447 a
CV %	8,61	9,11	18,37	20,02	54,31	55,23	53,51

Médias seguidas de mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

1: Tratamento 1 – Plantas só com patógeno; Tratamento 2 – Plantas com patógeno e aplicação semanal de Microgeo[®] a 1%; Tratamento 3 – Plantas com patógeno e aplicação quinzenal de Microgeo[®] a 1%; Tratamento 4 – Plantas com patógeno e aplicação quinzenal de Bioformulado a 1%, Tratamento 5 – Plantas com patógeno e aplicação semanal de Bioformulado a 1%; Tratamento 6 – Plantas tratadas com Bioformulado a 1% quinze dias antes da inoculação; Tratamento 7 – Plantas com patógeno com aplicação única de Microgeo[®] a 1%; Tratamento 8 – Plantas tratadas com Microgeo[®] a 1% quinze dias antes da inoculação; Tratamento 9 – Plantas com patógeno com aplicação única de Bioformulado a 1%.

5 CONCLUSÕES

Conclui-se a partir desta pesquisa, a existência de resultados positivos para a indução da atividade enzimática em plantas de milho pipoca em função da utilização de produtos naturais fermentados como o Microgeo[®] e o Bioformulado a base de Capim Limão.

As plantas de milho pipoca tratadas com o adubo orgânico Microgeo[®] e o Bioformulado feito com plantas medicinais, induzem a ativação das proteínas relacionadas à patogêneses (catalase, peroxidase, polifenoloxidase e β -1,3 glucanase).

A maior ativação de proteínas relacionadas a patogêneses em plantas de milho ocorreu principalmente 72 horas após da aplicação do Microgeo[®] ou do Bioformulado e na concentração de 1% para ambos os produtos.

Conclui-se que os tratamentos com aplicação de Microgeo[®] e Bioformulado não foram eficientes no controle da Cercosporiose em plantas de milho pipoca.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, R. El cultivo del maíz, su origen y clasificación. El maíz en Cuba. **Cultivos Tropicales**, v. 30, no. 2, p. 113-120. 2009.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. 4ª ed., San Diego, editora Academic Press. p. 310.1997
- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. St. Louis, MO: Academic Press. 2005.
- AGROCERES. **Guia Agrocere de sanidade**. São Paulo: Sementes Agrocere, 72 p. 1996.
- AIRAKI, M., CORPAS AGUIRRE, F. J., MARTÍNEZ, P., MANUEL, J. **Función de las especies de oxígeno y nitrógeno reactivo (ROS y RNS) en plantas de pimiento ("Capsicum annum" L.) durante el desarrollo y en estrés por baja temperatura**. Editorial de la Universidad de Granada. 2012.
- ALVES, M, S,A., NUNES, C, C. **Metodologia para elaboração de escalas diagramáticas para avaliação de doenças em plantas**. Comunicado Técnico 12. Embrapa. 6 p. 2012.
- ALVES, E., PERINA, F. J. Extratos vegetais e óleos essenciais na indução de resistência em plantas contra patógenos. In: Schwan-Estrada, K.R.F. et al.. (Org.). **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. 7 ed.Maringá: UEM. v. VII, p. 73-92. 2014.
- ALVES, B. M., FILHO, A. C., BURIN, C., TOEBE, M., DA SILVA, L. P. Divergência genética de milho transgênico em relação à produtividade de grãos e à qualidade nutricional. **Ciência Rural**, v 45, n. 5, p 884-891. 2015.
- ANGELOVA, Z.; GEORGIEV, S., ROSS, W. **Elicitation of plants**. **Biotechnol. Biotec** , v. 20, p. 72-83. 2006.
- ARAUJO, F. F. D., MENEZES, D. Indução de resistência a doenças foliares em tomateiro por indutores biótico (*Bacillus subtilis*) e abiótico (Acibenzolar-S-Metil). **Summa phytopathologica**, v. 35, n.3, p. 169-172. 2009.
- ARAÚJO, J. M. A.; **Química de Alimentos** – Teoria e Prática. 4. ed. Viçosa: editora: UFV, 2008.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta vulgaris. **Plant physiology**, v.24, n.1, p. 1. 1949.

AYERS, A. R., EBEL, J., VALENT, B., ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions X. Fractionation and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. **Plant Physiology**, v. 57, n.5, p. 760-765. 1976.

BARBOSA, A. DA S.; MEDEIROS, M. B. de. Potencial de ação elicitora dos biofertilizantes líquidos na indução de resistência sistêmica vegetal. Porto Alegre-RS, **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n. 2, p. 1453-1457, 2007

BARROS, F. C., SAGATA, É., DE CASTRO FERREIRA, L. C., JULIATTI, F. C. Indução de resistência em plantas à fitopatógenos. Induction of resistance in plants against phytopathogens. **Bioscience Journal**, v. 26, n.2. 2010.

BARROS, R. **Estudo sobre a aplicação foliar de Acibenzolar-s-metil para indução de resistência à ferrugem asiática em soja e Cercosporiose em milho**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.78, n.4, p.519-528, out./dez. 2011.

BAUERMEISTER, A., REZENDE, M. I., GIESE, E. C., DEKKER, R. F. H., DE MELO BARBOSA, A. beta-(1, 3)-Glucanases Fúngicas: Produção e Aplicações Biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.31, n.2, p. 75-86. 2010.

BETTIOL, W. Leite de vaca cru para o controle de oídio. **Embrapa Meio Ambiente**. (2004).

BETTIOL, W., TRATCH, R., GALVÃO, J. A. Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. **Embrapa Mandioca e Fruticultura**. 1998.

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, n.1-2, p. 248-254. 1976.

BRAGA, M.R. Fitoalexinas. In: PASCHOLATI, S.F. et al. (Eds) **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: EALQ.Cap.9, p.305-346. 2008.

BRUNELLI, K. R. **Cercospora zae-maydis: esporulação, diversidade morfo-genética e reação de linhagens de milho** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2004.

CADENA-GOMEZ, G., NICHOLSON, R. L. Papilla formation and associated peroxidase activity: A non-specific response to attempted fungal penetration of maize. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 31, n.1, p. 51-67. 1987.

CAMPBELL, C. L.; MADDEN, L. V. **Introduction to plant disease epidemiology** . 1. ed. New York: John Wiley, 532p. 1990.

CAMPOS, A. D.; FERREIRA, A. G.; HAMPE, M. M. V.; ANTUNES, I. F.; BRANCÃO, N.; SILVEIRA, E. P. Atividade de peroxidase e polifenoloxidase na resistência do feijão à antracnose. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39. Brasília. 2004.

CARLSON, G. A.; MAIN, C. E. Economics of disease loss management. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 14, p. 381-403, 1976.

CARNEIRO, S.M.I. Estudos em doenças de plantas. Goiania. Goiás: **Instituto Federal Goiano**, Campus Urutai, 2010.

CARNEIRO, C. E. A., ROLIM, H. M. V., FERNANDES, K. F. Estudo das atividades de peroxidases e polifenoloxidase de guariroba (*Syagrus oleracea* Becc) sob a ação de diferentes inibidores. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 25, n. 1, p. 189-193. 2008.

CARPENTIERI-PÍPOLO, V., TAKAHASHI, H. W., ENDO, R. M., PETEK, M. R., SEIFERT, A. L. Correlações entre caracteres quantitativos em milho pipoca. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p. 551-554. 2002.

CASELA, C.R.; FERREIRA, A.S. A Cercosporiose na cultura do milho. Sete Lagoas: **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA)**,. 15p. (Circular Técnica 24). 2003.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R.; Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. (Ed.) **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**, 264p. Piracicaba, FEALQ. p.81-124. 2005.

COLARES, M. R. N., BONALDO, S. M. Uso de biofertilizantes na indução de resistência em plantas a patógenos. In: SCHWAN-ESTRADA, K.R.F.; DA SILVA, C.M.; MAIA, A.J.; FARIA, C.M.D.R.; COLELLA, J.C.T.. (Org.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. VII ed. Maringá: Suprema Gráfica e Editora Ltda, v. 1, p. 55-72. 2014.

CODOGNOTTO, L. M.; SANTOS, D. M. M.; LEITE, I. C.; MARIN, A.; MADALENO, L. L.; KOBORI, N. N; BANZATTO, D. A. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. **Revista Ecosistema, Espírito Santo do Pinhal**, v. 27, n. 2, p. 27-39, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos/ quinto levantamento**. v. 4. 166 p. Fevereiro. 2017.

CONSTABEL, C. P., BERGEY, D. R., RYAN, C. A. Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, n.2, p. 407-411. 1995.

COSTA, F.M. **Análise da curva de progresso temporal de doenças foliares na cultura do milho *Zeamays L.* , sob a aplicação da mistura de fungicidas triazóis e estrobirulinas.** 2007.56 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal)- Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho-Jaboticabal, 2007.

CRAFT, V. L.M. **Estabilidade e Adaptabilidade de híbridos de milho pelos procedimentos estatísticos AMMI - Clássico e AMMI - Bayesiano para cercosporiose /** VALENTINA DE LOURDES MILANI CRAFT – Tesis Doutoral em Agronomia. Maringá, 89f. 2015.

CURTI, M. **Síntese de fitoalexinas em sorgo e soja, controle de oídio e produção de pepino, Cv. Hokushin, por leite fermentado, mananoligossacarídeo fosforilado e Kefir** (Doctoral dissertation, Doctoral Thesis, Universidade Estadual de Maringa). 2010.

DALBELLO, O, PREVIERO, C., ALVES, D. Capacidade de expansão do milho pipoca (*Zea mays L.*) em função de parâmetros de secagem, umidade e armazenamento do produto. In **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AGRÍCOLA**, v.. 24. 1995.

DANTAS, S. A. F., OLIVEIRA, S. M., BEZERRA NETO, E., COELHO, R. S. B., SILVA, R. D. Indutores de resistência na proteção do mamão contra podridões pós-colheita. **Summa Phytopathologica**, v.30, n.4, p. 314-319. 2004.

DAUB, M. E., EHRENSHAFT, M. The photoactivated Cercospora toxin cercosporin: contributions to plant disease and fundamental biology. **Annual review of phytopathology**, v.38, n. 1, p. 461-490. 2000.

DEFFUNE, G. Semioquímicos, fitoalexinas e resistência sistêmica vegetal na agricultura orgânica: a explicação dos defensivos agrícolas. In Hortibio: 1º **Congresso Brasileiro de Horticultura Orgânica, Natural, Ecológica e Biodinâmica**. Resumos. Botucatu-SP: Agroecológica p. 33-43. 2001.

DEL RIO, L. A.; SANDALIO, L. M.; CORPAS, F. J.; PALMA, J. M; J. B. BARROSO. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. **Plant Physiology**, v. 141, n. 2, p. 330–335, 2006.

de Medeiros, M. B., da Silva Lopes, J. **Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola**. 2006.

DING, C. K., CHACHIN, K., UEDA, Y., IMAHORI, Y., WANG, C. Y. Metabolism of phenolic compounds during loquat fruit development. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n.6, p. 2883-2888. 2001

DUNG MAL, K., APENTEN, R.K.O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry, London**, v.64, p. 351-359. 1999.

DUNKLE, L. D.; LEVY, M. Genetic relatedness of African and United States populations of *Cercospora zeae-maydis*. **Phytopathology**. Saint Paul, v. 90, p 486-490, 2000.

EMBRAPA, **Sistema Embrapa de Bibliotecas** – SEB. Disponível em <<https://www.embrapa.br/seb>> Acesso em outubro 15, 2015.

EMBRAPA MILHO E SORGO, 2003. **Circular Técnica 24**. Disponível em <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/487543/1/Circ24.pdf>> Acesso em outubro 29, 2015.

EMBRAPA MILHO E SORGO, 2004. **Circular Técnica 128**. Disponível em <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPF-2009-09/38230/1/com_tec128.pdf> Acesso em novembro 14, 2015.

EMBRAPA MILHO E SORGO, 2009. Sistemas de produção 2 versão eletrônica – 5a edição. Disponível em < http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/milho_5_ed/referencias.htm> Acesso em Fevereiro, 2017.

EMBRAPA, **Jornal eletrônico da Embrapa Milho e Sorgo**. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/grao/7_edicao/grao_em_grao_materia_03.htm> Acesso em outubro 18, 2015.

EMBRAPA MILHO E SORGO, 2006. **Circular Técnica 83**. Disponível em <http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publica/2006/circular/Circ_83.pdf> Acesso em outubro 20, 2015.

ENGELSING, M. J., ROZZETTO, D. S., COIMBRA, J. L. M., ZANIN, C. G., GUIDOLIN, A. F. Capacidade de combinação em milho para resistência a *Cercospora zeae-maydis*. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.1, p. 232-241. 2011.

ERDAL, S. Androsterone-induced molecular and physiological changes in maize seedlings in response to chilling stress. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.57, p. 1-7. 2012.

FACHIN, D.T.; SCHEER, A.P.; SAMPAIO, E. *et al.* Elaboração de pós para bebidas utilizando milho pipoca. **Boletim do CEPPA**, Curitiba, v. 11, n. 1, p. 1116. 1993.

FANCELLI, A. L.; DOURADO NETO, D. **Milho: tecnologia e produtividade**. Piracicaba: ESALQ/USP/LPV, 259 p. 2001.

FANCELLI, A.L.; DOURADO-NETO, D. **Milho: estratégias de manejo para a alta produtividade**. Piracicaba. ESALQ/USP, 208 p. 2003.

FANTIN, G. M., DUARTE, A. P., DUDIENAS, C., GALLO, P. B., RAMOS JÚNIOR, E. U., CRUZ, F. A., RAMOS, V. J., FREITAS, R. S., DENUCCI, S., TICELLI, M. Efeito da

Cercosporiose na produtividade do milho safrinha no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 7, p. 231-250, 2008.

FREIRE, A. I. **Avaliação da capacidade de expansão de milho-pipoca pelas técnicas de espectrometria no infravermelho próximo, composição química e microscopia eletrônica**. 2015.

GALVAO, J. C. C., SAWAZAKI, E., MIRANDA, G. V. **Comportamento de híbridos de milho-pipoca em Coimbra, Minas Gerais/behavior of popcorn hybrids in Coimbra, Minas Gerais, Brazil**. *Ceres*, v. 47, 270p. 2015.

GAMA, E. E., MAGNAVACA, R., SILVA, J. D., SANS, L. M. A., VIANA, P. A., PARENTONI, S. N., FERNANDES, F. T. **Milho-pipoca. Informe Agropecuário**, v.14 165p. 1990.

GAYATRIDEVI, S., JAYALAKSHMI, S. K., SREERAMULU, K. Salicylic acid is a modulator of catalase isozymes in chickpea plants infected with *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceri. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.52, p. 154-161. 2012.

GHINI, R., KIMATI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. 1ª edição. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 78p. 2000.

GILL, S. S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant physiology and biochemistry**, v.48, n.12, p. 909-930. 2010.

GUZZO, S. D. **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*** (Doctoral dissertation, Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo). 2004.

HAHN, M. Microbial elicitors and their receptors in plants. **Annu. Rev. Phytopathol**, v.34, p.87-412. 1999.

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

HAMMOND-KOSACK, K. E., PARKER, J. E..Deciphering plant pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding.**Curr.Opin.Biotechnol.** v.14, p. 77–193. 2003

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo Agropecuário 2006**: Brasil,grandes regiões e unidades da federação: a puraça o. Rio de Janeiro,. 774 p. 2014.

ITAKO, A. T., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., STANGARLIN, J. R., TOLENTINO JÚNIOR, J. B., CRUZ, M. E. S. Controle de *Cladosporium fulvum* em tomateiro por extratos de plantas medicinais. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p. 75-83. 2009.

JEGLAY, Y., CRUZ, H. Relación suelo-planta-hombre en el cultivo del maíz (*Zea mays L.*). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Posgrado en Ciencias del Suelo. **Cátedra de Relación Suelo-Planta**, p. 1-7. 2006.

JONES, J. D., DANGL, J. L. **The plant immune system**. *Nature*, v. 444, P. 323-329. 2006.

JÚNIOR, F., DO AMARAL JÚNIOR, A. T., PEREIRA, M. G., CRUZ, C. D., SCAPIM, C. A. Capacidade combinatória de milho pipoca por meio de dialelo circulante. **Pesq. Agropecu. Bras., Brasília**, v. 41, n.11, p. 1599-1607. 2006.

JUNQUEIRA, A. C. B. **Alterações bioquímicas em plantas de milho infectadas pelo fitoplasma do enfezamento vermelho** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2003.

KEEN, N. The molecular biology of disease resistance. **Plant Molecular Biology** v.19, p. 109-122. 1992.

KOSHIKUMO, É. S. M. **Epidemiologia da mancha de phaeosphaeria e da Cercosporiose em milho**. 2007.

KUHN, O. J. **Indução de resistência em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) por acibenzolar-S-metil e *Bacillus cereus*: aspectos fisiológicos, bioquímicos e parâmetros de crescimento e produção** (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”). 2007.

LANUBILE, A., BERNARDI, J., MAROCCO, A., LOGRIECO, A., PACIOLLA, C. Differential activation of defense genes and enzymes in maize genotypes with contrasting levels of resistance to *Fusarium verticillioides*. **Environmental and Experimental Botany**, v.78, p. 39-46. 2012.

LEVER, M. A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical biochemistry**, v.47, n.1, p. 273-279. 1972.

LIMA DAS NEVES, D. **Ocorrência e caracterização de espécies de associadas à mancha foliar do milho em Goiás e Paraná**. Dissertação do Mestrado em Agronomia, Universidade estadual de Agronomia. 52p. 2012.

LINARES, E. **Seleção recorrente recíproca em famílias de meio-irmãos em milho pipoca (*Zeamays L.*)**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 78 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia). 1987.

LIU, H., JIANG, W., BI, Y., LUO, Y. Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, v.35, n.3, p. 263-269. 2005.

LIZÁRRAGA-PAULÍN, E.G., TORRES-PACHECO, I., MORENO-MARTÍNEZ, E., MIRANDA-CASTRO, S. P. Protección contra estrés biótico inducida por quitosán en plántulas de maíz (*Zea mays* L.). **Revista mexicana de ciencias agrícolas**, v.2, n.6, p. 813-827. 2011.

LUSSO, M. F. G., PASCHOLATI, S. F. Activity and isoenzymatic pattern of soluble peroxidases in maize tissues after mechanical injury or fungal inoculation. **Summa Phytopathologica**, v.25, n.3. 1999.

MAC KEY, J. Genetic interaction and breeding strategies in relation to fungal cereal diseases. In: SIDDIQUI, K.A., FARUQUI, A.M. **New genetical approaches to crop improvement. Karaehi**, p.503-525. 1986.

MAGALHÃES, PAULO CÉSAR. **Fisiologia do milho**. CEP, v. 35701, p. 970. 2002.

MARGIS-PUNHEIRO, M., SANDRONI, M., LUMMERZHEIM, M., DULCE, E. A defesa das plantas contra as doenças. **Ciência Hoje**, p. 26-31. 1999.

MARTINS, E. M. F. Proteínas relacionadas à patogênese. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 387-410. 2008

MATHIONI, S. M. **Agressividade de isolados de *Cercospora zeae-maydis* em genótipos de milho** (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”). 2006.

MATIELLO, R. R., BARBIERI, R. L., CARVALHO, F. I. F. D. Resistência das plantas a moléstias fúngicas. **Ciencia Rural**. Santa Maria. v. 27, n. 1, p. 161-168. 1997.

MEDEIROS, M. B. D. **Ação de biofertilizantes líquidos sobre a bioecologia do ácaro *Brevipalpus phoenicis*** (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo). 2002.

MENEZES, H. Imunidade inata e específica em plantas. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.30, n.2, p. 195-212. 2009.

MESQUINI, R. M., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., BONALDO, S. M., NASCIMENTO, J. F., BALBI-PEÑA, M. I. efeito de produtos naturais na indução de fitoalexinas em soja e na germinação de uredinósporos de *Phakopsora pachyrhizi* agente causal da ferrugem asiática. **Cadernos de Agroecologia**, v. 2, n.2. 2007.

MÉTRAUX, J.P. Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, p. 13-18. 2001.

MICROGEO® - **ADUBAÇÃO BILÓGICA**. Disponível em: <http://www.microgeo.com.br>
Acesso em outubro 16, 2015

MIOTTO, A.A. **Avaliação de famílias S3 de milho-pipoca via topcrosses**. (Dissertação mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Agronomia, Programa de Pós – Graduação em Agronomia, 2013.

MMA-Ministério do Meio Ambiente. **Agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em outubro 17, 2015.

MORAES, W. C. Controle alternativo de fitopatógenos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 27, p. 175-190, 1992.

MORAES, S. D. **Quantificação de doenças de plantas**. 2007. *Artigo em Hypertexto*. Disponível em: < http://www.infobibos.com/Artigos/2007_1/doencas/index.htm >. Acesso em, outubro 17, 2015.

NOGUEIRA, L. **Categorias e níveis de resistência de genótipos de milho crioulo a *Spodoptera frugiperda* (JE Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae)**. 2015.

NUTTER, F. W.; GLEASON, M. L.; JENCO, J. H.; CHRISTIANS, N. C. Assessing the accuracy, intra-rater repeatability, and inter-rater reliability of disease assessment systems. **Phytopathology**, v. 83, p.806–812, 1993.

OKOT-KOTBER, M., LIAVOGA, A., YONG, K. J., BAGOROGOZA, K. Activation of polyphenol oxidase in extracts of bran from several wheat (*Triticum aestivum*) cultivars using organic solvents, detergents, and chaotropes. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.50, n.8, p. 2410-2417.

ORDEÑANA, K. M. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. **Revista Manejo Integrado de Plagas**. Costa Rica, v.63, p. 22-32. 2002.

PARLEVLIET, J.E.; Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. **Annual Review Phytopathology**, v.17, p. 203-222, 1979.

PASCHOLATI, S. F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: Bergamin Filho, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds.) **Manual de Fitopatologia - Princípios e Conceitos**. São Paulo. Ed. Agronômica Ceres. p.417-454. 1995.

PEREIRA A. O P.; CARVALHO R.V.; CAMARGO L.E.A. Doenças do milho (*Zeamays* L.). In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; BERGAMIM FILHO; A.; CAMARGO L.E.A. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: Doenças de Plantas cultivadas**. Piracicaba: Ceres, , cap. 55, v.2 p. 477-488. 2005.

PETEIRA, B., FERNÁNDEZ, A., RODRÍGUEZ, H., GONZÁLEZ, E. Efecto del Bion y del Fitomas como inductores de resistencia en plantas de arroz infestadas con *Stenotarsonemus spinki*. **Revista de Protección Vegetal**, v.23, n.1, p. 32-37. 2008.

PILA, L. ; GUERRA, M. P. ; STEINMACHER, D. A. . embriogênese somática em três genótipos de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) do equador. In: XIX Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecido de Plantas, 2013, Recife-Pernambuco. **XIX Congresso Brasileiro de Floricultura e Plantas Ornamentais e VI Congresso Brasileiro de Cultura de Tecido de Plantas**, 2013.

PINTO, N. F. J.; ANGELIS, B. D., HABE, M. H. Avaliação da eficiência de fungicidas no controle da Cercosporiose (*Cercospora zeae-maydis*) na cultura do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 03, n. 1, p. 139-145, 2004.

PINTO, N.F.J.A.; Cercosporiose em milho. **Embrapa Milho e Sorgo**. 2014. Disponível em:<http://www.agrolink.com.br/culturas/soja/artigo/cercosporiose-em-milho_198180.html> Acesso em: 19, setembro, 2014.

PINTO, M. D. S. T., RIBEIRO, J. M., DE OLIVEIRA, E. A. G. O estudo de genes e proteínas de defesa em plantas. **Revista Brasileira de Biociências**, v.9, n.2. 2011.

RANGEL, R. M., AMARAL JÚNIOR, A. T., GONÇALVES, L. S. A., FREITAS JÚNIOR, S. P., CANDIDO, L. S. Análise biométrica de ganhos por seleção em população de milho pipoca de quinto ciclo de seleção recorrente. **Revista Ciência Agronômica**, v.42, n.2, p. 473-481. 2011.

RESENDE, M.L.V., NOJOSA, G.B.A., AGUILAR, M.A.G., SILVA, L.H.C.P., NIELLA, G.R., CARVALHO, G.A., GIOVANINI, G.R., CASTRO, R.M. Perspectivas da indução de resistência em cacaueiro contra *Crinipellis perniciosus* através do benzoatiazole (BTH). **Fitopatologia Brasileira**, v. 25, p. 149-156. 2000.

RESENDE, M. L. V., CAVALCANTI, F. R., SANTOS, F. S.; AMARAL, D. R.; RIBEIRO, P. M., COSTA, J. C. B., CAMILO, F. R.; ISHIDA, A. K. N., SOUZA, R. M. Novos indutores de resistência contra doenças em cafeeiro, cacaueiro, algodoeiro e tomateiro: Perspectivas de utilização. In: RODRIGUEZ, F.; ROMEIRO, R. Indução de resistência em plantas a patógenos. **REUNIÃO BRASILEIRA DOBRE INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA A PATÓGENOS**, v.3., 2007. Viçosa, Anais... Viçosa, p. 161-182. 2007.

RIBEIRO JUNIOR, P. M.; RESENDE, M. L. V. Indutores disponíveis comercialmente. Workshop Insumos para Agricultura Sustentável, **Embrapa Clima Temperado**, Pelotas, 2012.

RODRIGUES, F. A., VALE, F. X. R., KORNDÖRFER, G. H., PRABHU, A. S., DATNOFF, L. E., OLIVEIRA, A. M. A., ZAMBOLIM, L. Influence of silicon on sheath blight of rice in Brazil. **Crop Protection**, v.22, n.1, p. 23-29. 2003.

ROMEIRO, R. S. Indução de resistência em plantas à patógenos. In: PASCHOLATI, S. F. et al **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e molecular**. 627p. Piracicaba, FEALQ, p.411-432, 2008.

SALVADOR-FIGUEROA, M., PÉREZ-FLORES, L., VELÁZQUEZ-OVALLE, G., TLATELPA-DIAZ, M., DE LOURDES ADRIANO-ANAYA, M. **Dinámica de enzimas antioxidantes en plantas de maíz inoculado con bacterias diazotróficas y sometido a sequía**. 2013.

SCAPIM, C. A., PACHECO, C. A. P., TONET, A., BRACCINI, A. D. L., PINTO, R. J. B. Análise dialélica e heterose de populações de milho-pipoca. **Bragantia**, v. 61, n.3, p. 219-230. 2002.

SEO, P. J., LEE, A. K., XIANG, F., PARK, C. M. Molecular and functional profiling of Arabidopsis pathogenesis-related genes: insights into their roles in salt response of seed germination. **Plant and Cell Physiology**, v.49, n.3, p. 334-344. 2008.

SERRATOS, H. J. A. El origen y la diversidad del maíz en el continente Americano. **Greenpeace**. México, DF. 2009.

SEVERINO, F. J. CARVALHO, S. J. P., CHRISTOFFOLETI, P. J. Interferências mútuas entre a cultura do milho, espécies forrageiras e plantas daninhas em um sistema de consórcio. **III- Implicações sobre as plantas daninhas. Planta Daninha**, v.24, n. 1, p. 53-60. 2006.

SILVA, V. Q. R.; AMARAL JÚNIOR, A. T.; FREITAS JUNIOR, S. P.; SCAPIM, C. A.; VITTORAZZI, C.; SILVA, T. R. C.; CARVALHO, G. F. capacidade combinatoria entre linhagens de milho pipoca. **ANAIS DO 5º Congresso Brasileiro de Melhoramento de Plantas**. 2009

SILVA, L. H. C., RESENDE, M. L. V., SOUZA, R. M., CAMPOS, J. R. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-s-metil na proteção contra *Xanthomonas vesicatoria*, *Oidium lycopersici* e *Septoria lycopersici* em tomateiro. **Summa phytopatológica**, v.29, n.3, p. 244-248. 2003.

SILVA, H. P.; FANTIN, G. M.; RESENDE, I. C.; PINTO, N. F. J. A.; CARVALHO, R. V. Manejo integrado de doenças na cultura do milho safrinha. In: **SEMINARIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA**, 6.; CONFERENCIA NACIONAL DE POS-COLHEITA SAG-MERCOSUL, 2.; SIMPOSIO EM ARMAZENAGEM DE GRAOS DO MERCOSUL, 2., 2001, Londrina. A cultura do milho safrinha: valorização da produção e conservação de grãos no Mercosul. Londrina: IAPAR, p. 113-144. 2001

SILVA, H.P. Incidência de doenças fungicas na “safrinha”. In **IV seminário sobre a cultura do milho “Safrinha”**, Campinas, 1997. Anais. Campinas: IAC/CDV, p. 81-86. 1997.

SIMON, J.M. **Extratos vegetais e produtos comerciais no controle de *Diplocarpon rosae* e na indução de resistência em roseiras**. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Estadual de Maringá. 66p. 2016.

SMITH, C. J. Tansley Review No. 86 Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. **New phytologist**, v.132, n.1, p. 1-45. 1996.

SOUZA, M. W. D. L., CUNHA, R. C. D., COSTA, P. A. D. A., MOURA, I. N. B., BEZERRA, F. M. S., LIMA, L. A., OLIVEIRA, F. D. A. D. Desenvolvimento inicial de milho doce e milho pipoca sob estresse salino. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v.10, n.3, p. 65-72. 2014.

STICHER, L., MAUCH-MANI, B., MÉTRAUX, A. J. Systemic acquired resistance. **Annual review of phytopathology**, v.35, n.1, p. 235-270. 1997.

STREIT, N. M., CANTERLE, L. P., CANTO, M. W. D., HECKTHEUER, L. H. H. The chlorophylls. **Ciência Rural**, v.35, n.3, p. 748-755. 2005.

SYTYKIEWICZ, H. Transcriptional responses of catalase genes in maize seedlings exposed to cereal aphids' herbivory. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.60, p. 131-142. 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed. 848p. 2009,

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Tradução de Eliane Romanato Santarém et. al. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 719 p. 2004.

TALAAT, N. B., SHAWKY, B. T., IBRAHIM, A. S.. Alleviation of drought-induced oxidative stress in maize (*Zea mays* L.) plants by dual application of 24-epibrassinolide and spermine. **Environmental and Experimental Botany**, v.113, p. 47-58. 2015.

TEHON, L.R.; DANIELS, E. Notes on the parasitic fungi of Illinois. **Mycologia**, v. 17, p. 240-249, 1925.

TOMÁNKOVÁ, K., LUHOVÁ, L., PETŘIVÁLSKÝ, M., PEČ, P., LEBEDA, A. Biochemical aspects of reactive oxygen species formation in the interaction between *Lycopersicon* spp. and *Oidium neolycopersici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.68, n.1, p. 22-32. 2006.

USDA (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE), World corn supply and use. World agricultural supply and demand estimates. Acesso em novembro 20, 2016.

VALE, F. X. R. DO; JESUS JUNIOR, W. C. DE; LIBERATO, J. R.; SOUZA, C. A. de. Quantificação de doenças e do crescimento do hospedeiro. **In: EPIDEMIOLOGIA aplicada ao manejo de doenças de plantas**. Belo Horizonte: Perfíl, p. 91–121. 2004.

VAN BREUSEGEM, F., VRANOVÁ, E., DAT, J. F., INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, n.3, p. 405-414. 2001.

VAN LOON, L. C., REP, M., PIETERSE, C. M. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annu. Rev. Phytopathol.**, v.44, p. 135-162. 2006.

VAN LOON, L. C.; VAN STRIEN, E. A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.55, p. 85-97. 1999.

VAZ-DE-MELO, A., SANTOS, L. D. T., FINOTO, E. L., DOS SANTOS DIAS, D. C. F., ALVARENGA, E. M. Germinação e vigor de sementes de milho-pipoca submetidas ao estresse térmico e hídrico= Germination and vigor of pop corn seeds submitted to thermal and water stress. **Bioscience Journal**, v.28, n.5. 2012.

VIÉGAS, .p. Alguns fungos do Brasil, Rio de Janeiro: **Sociedade Brasileira de Agronomia**, (Boletim, 8). 1945.

VIVANCO, J. M., COSIO, E., LOYOLA-VARGAS, V. M., FLORES, H. E. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. **Investigación y ciencia**, v.341, n.2, p. 68-75. 2005.

VOGELSANG, R., BARZ, W. **Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1, 3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.)**. **Planta**, v. 189, n. 1, p. 60-69. 1993.

VON ELBE J.H. Colorantes. In: FENNEMA, O.W. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza : Wisconsin - Madison, Cap.10, p.782-799. 2000.

WARD, J. M. J., STROMBERG, E. L., NOWELL, D. C., NUTTER JR, F. W., Gray leaf spot: a disease of global importance in maize production. **Plant Disease**, v. 83, p. 884-895, 1999.

WARD, J. M. J., NOWELL, D. C. Integrated management practices for the control of maize grey leaf spot. **Integrated Pest Management Reviews**, v. 3, p. 177–188, 1998.

WARD, J. M. J.; BIRCH, E. B.; NOWELL, D. C. Grey leaf spot on maize. Pietermaritzburg: Cedara Agric. Develop. Inst.. **(Coordinated extension in Maize in Natal)**. 1994

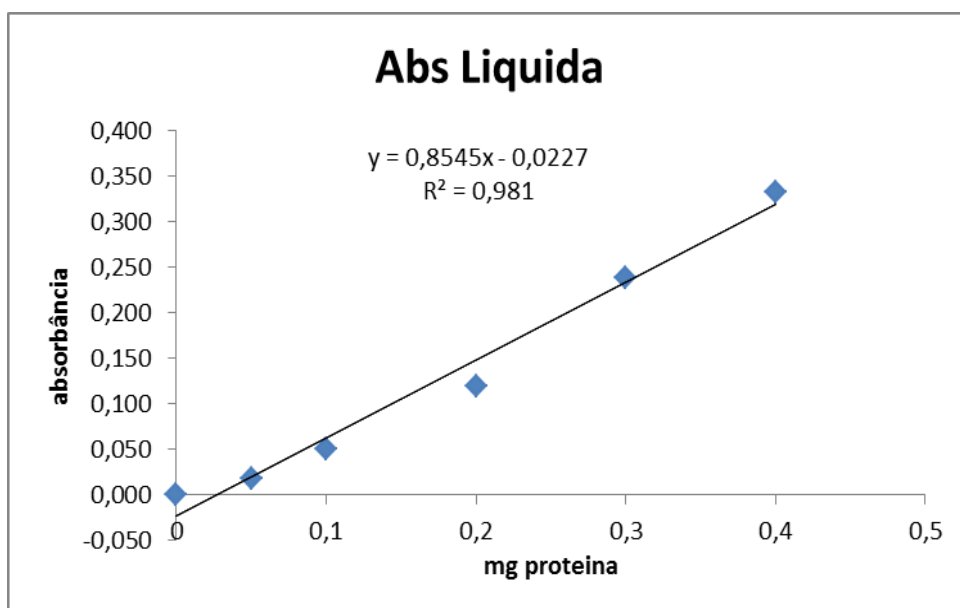
WHITE, D. G. Compendium of corn diseases. 3th Edition. Saint Paul MN. American Phytopathological Society. APS Press. In: CASA, R. T., REIS, E. M., ZAMBOLIM, L. 2006. Doenças do milho causadas por fungos do gênero *Stenocarpella*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, p. 427-439. 1999.

ZAIA, D. A., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química nova**, v. 21, n.6, p. 787-793. 1998.

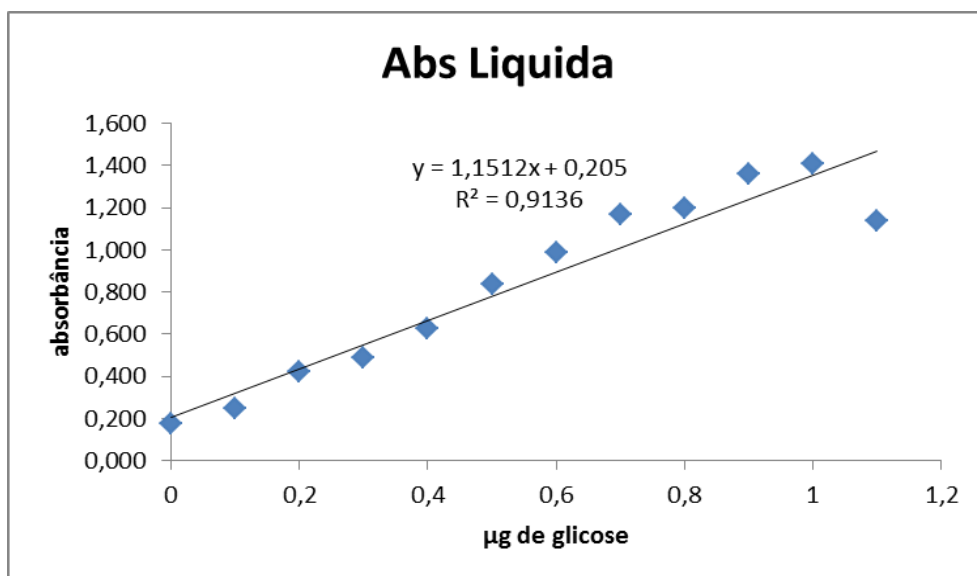
ZAMORA, J.E.G., MARTÍNEZ, N.L., GUERRERO, M.A., FUENTES-GUERRA, J.M.U., HERNÁNDEZ, C.A. page_09. **Retrieved** November 23, 2015, from ocwus Web site: http://ocwus.us.es/produccion-vegetal/sanidad-vegetal/tema_19/page_09.htm. 2009.

ZINSLEY, J. R., MACHADO, J. A., PATERNIANI, E., VIEGAS, G. Milho-pipoca. Melhoramento e produção do milho. Campinas: **Fundação Cargill**, 2, 413-422. 1987.

APÊNDICES



Apêndice A. Curva padrão de albumina com soro bovino (absorbância a 595 nm)



Apêndice B. Curva padrão para glicose (absorbância a 410 nm)