

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

Gabriel Wobeto Burtet

**SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO AO CONTROLE
QUÍMICO SOBRE A SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis* EM MILHO**

Santa Maria, RS
2018

Gabriel Wobeto Burtet

SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO AO CONTROLE QUÍMICO SOBRE A SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis* EM MILHO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia - Produção Vegetal**

Orientador: Prof. Ivan Francisco Dressler da Costa

Santa Maria, RS
2018

Burtet, Gabriel

SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO AO
CONTROLE QUÍMICO SOBRE A SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis*
EM MILHO / Gabriel Burtet.- 2018.

64 p.; 30 cm

Orientador: Ivan Francisco Dressler da Costa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Agronomia, RS, 2018

1. Doença 2. Indução de Defesas 3. Mancha Branca 4. Zea
Mays I. Francisco Dressler da Costa, Ivan II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

©2018

Todos os direitos autorais reservados a Gabriel Wobeto Burtet. A reprodução de parte ou todo desde trabalho só poderá ser feita mediante a citação de fonte.

Endereço: Rua Maria Dalafiora Costa, n. 27, Bairro Residencial Firenze, Primavera do Leste, MT, CEP 78850-000

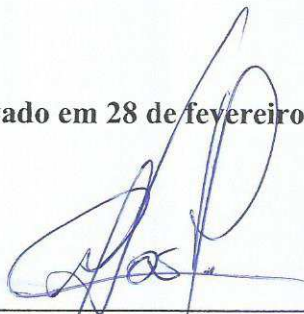
Fone (055) 55 99670 9645; E-mail: gabrielwburtet@gmail.com

Gabriel Wobeto Burtet

SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO AO CONTROLE QUÍMICO SOBRE A SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis* EM MILHO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Agronomia - Produção Vegetal**

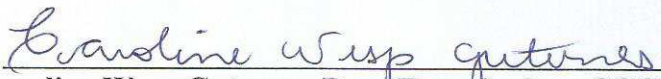
Aprovado em 28 de fevereiro de 2018:



Ivan Francisco Dressler da Costa, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Thomas Newton Martin, Dr. (UFSM)



Caroline Wesp Guterres, Dra. (Pesquisadora CCGL)

Santa Maria, RS

2018

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho só ocorreu devido ao auxílio, dedicação e contribuição de várias pessoas, por isso agradeço a todos que estiveram presentes nessa etapa da minha vida, agradeço:

A Deus, pela oportunidade de evoluir pessoalmente e profissionalmente.

Ao meu pai e mãe, Sergio Luís Burtet e Eliane Regina Wobeto, pelo amor e apoio dado e principalmente por serem exemplos de vida, caráter e determinação que me tornaram a pessoa que sou hoje.

Aos meus irmãos, Dener Wobeto Burtet e Laura Wobeto Burtet, pelo carinho e companheirismo sempre.

Aos meus tios Maristane Burtet e Jose Cleber, pelo apoio e carinho dados em Santa Maria, visto a distância que estive de meus pais.

Aos meus avós, por toda experiência e exemplo vida.

À minha namorada, Camila Maydana Ribeiro, pelo amor, dedicação, auxílio e compreensão nos momentos difíceis, bem como sua família, que nunca mediu esforços para que eu me sentisse sempre em casa, meu muito obrigado.

Aos colegas, ex-colegas e funcionários do laboratório e setor de Defesa Fitossanitária, pelo apoio nas atividades de pesquisa.

Em especial aos amigos, Fernando Saccol, Renato Guerra, Cassio Ben, Guilherme Londero, Matheus Marinho e Igor Honnef.

Ao meu amigo, irmão e colega de graduação e pós-graduação Antonio Mazuco, pelo apoio e ajuda nos momentos bons e ruins.

Aos colegas de Agronomia, que hoje denomino de irmãos, Lenon Brandt, Diego Copetti, Fabricio Delatorre, pelo apoio e irmandade criada.

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade fornecida.

Ao meu orientador Ivan Francisco Dressler da Costa, pela orientação, pela confiança e oportunidade de gerar pesquisas durante dois anos na pós-graduação.

Ao professor co-orientador Thomas Martin pelos conselhos e disponibilidade do campo experimental que possibilitaram o desenvolvimento do trabalho.

À banca examinadora pelas contribuições e sugestões.

Enfim a todos àqueles que fazem parte da minha vida e que são essenciais para mim.

Cada consciência é filha das próprias obras; cada conquista é serviço de cada um; Deus não tem prerrogativas ou exceções; toda glória tem preço; é a lei do mérito, da qual ninguém escapa.

(Chico Xavier por Emmanuel)

RESUMO

SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* ASSOCIADO AO CONTROLE QUÍMICO SOBRE A SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis* EM MILHO

AUTOR: Gabriel Wobeto Burtet

ORIENTADOR: Ivan Francisco Dressler Da Costa

A mancha branca do milho (MBM) (*Pantoea ananatis*) é a principal doença da cultura, em condições severas, reduz significativamente sua produtividade. A utilização de híbridos suscetíveis à MBM torna necessário o uso de produtos químicos no controle da doença. Diversos agentes bióticos e abióticos são considerados indutores de defesas. Induzir as defesas das plantas de milho pode ser uma alternativa no controle da doença, auxiliando os produtos químicos. O objetivo do trabalho foi avaliar a redução da severidade da MBM por silício e *Azospirillum brasilense*, associados ou não a dois fungicidas (picoxistrobina + ciproconazole e mancozebe) e um antibiótico (casugamicina). Os experimentos foram divididos em casa-de-vegetação, campo e laboratório. Em casa-de-vegetação foram avaliados os efeitos dos possíveis indutores de defesa, silício e *Azospirillum brasilense*, na redução da severidade da MBM, pela inoculação de um isolado de *Pantoea ananatis* em três híbridos de milho suscetíveis (P1680YH, AG8780 e SUPREMO). Os tratamentos com silício e *A. brasilense* reduziram significativamente a severidade da MBM no híbrido P1680YH. Entretanto, nos demais híbridos não houve diferença significativa entre os tratamentos. O experimento a campo avaliou as combinações do silício e *A. brasilense* com os produtos químicos na redução da severidade da MBM e sobre a produtividade, utilizando o híbrido P1680YH. Dentre os tratamentos químicos, o fungicida mancozebe resultou na menor taxa de progresso e área abaixo da curva de progresso da MBM, resultando na maior produtividade da cultura. As combinações com silício resultaram em uma menor severidade da MBM, auxiliando os produtos químicos, com reflexos na produtividade da cultura. O *Azospirillum brasilense* combinado com os produtos químicos não reduziu a severidade da MBM. Porém seus efeitos sobre a fisiologia da cultura resultaram em maior produtividade, superando aos tratamentos com silício. O experimento em laboratório avaliou a eficácia dos produtos químicos testados sob a população de colônias da *Pantoea ananatis* em placas de petri. A bactéria apresentou uma elevada sensibilidade ao fungicida mancozebe, uma baixa sensibilidade aos antibiótico casugamicina e foi insensível aos ingredientes ativos ciproconazol e picoxistrobina, isolados ou associados.

Palavras-chave: Doença. Indução de Defesas. Mancha Branca. Zea Mays.

ABSTRACT

SILICON E *Azospirillum brasilense* ASSOCIATED TO CHEMICAL CONTROL ABOUT THE SEVERITY OF *Pantoea ananatis* IN CORN

AUTHOR: Gabriel Wobeto Burtet
ADVISOR: Ivan Francisco Dressler da Costa

The maize white spot (MWS) (*Pantoea ananatis*) is the main disease of culture, under severe conditions, significantly reduces your productivity. The use of hybrids susceptible to MWS makes it necessary to use chemicals to control the disease. Several biotic and abiotic agents are considered defensive inducers. Inducing the defences of maize plants can be an alternative in the control of the disease, aiding the chemical products. The objective of the paper was to evaluate in reducing the severity of MWS by silicon and *Azospirillum brasilense*, associated or not to two fungicides (picoxystrobin + ciproconazole and mancozebe) and an antibiotic (casugamycin). The experiments were divided into greenhouse, field and laboratory. In greenhouse were evaluated the effects of possible defence inducers, silicon and *Azospirillum brasilense*, on the reduction of MWS severity, by the inoculation of a *Pantoea ananatis* isolate in three susceptible maize hybrids (P1680YH, AG8780 e SUPREMO). The treatments with silicon and *A. brasilense* significantly reduced the severity of MWS in the hybrid P1680YH. However, in the other hybrids there was not significant difference between the treatments. The field experiment evaluated the combination of silicon, *Azospirillum brasilense* and chemicals in reducing severity of MWS and productivity, using hybrid P1680YH. Among the chemical treatments, the fungicide mancozebe had the lowest rate of progress and area below the disease progress curve of MWS, with reflections on crop productivity. The combinations with silicon resulted in a lower MWS severity, aiding the chemicals, resulting in a higher crop productivity. *Azospirillum brasilense* combined with the products did not reduce the severity of the MWS, but its effects on the physiology of the culture resulted in a higher productivity, superior to the treatments with silicon. The laboratory experiment evaluated the efficiency of the tested chemicals under the population of *Pantoea ananatis* colonies in petri dishes. The bacterium presented a high sensitivity to the fungicide mancozebe, a low sensitivity to the antibiotic casugamycin and was insensitive to the active ingredients cyproconazole and picoxystrobin, isolated or associated.

Key words: Disease. Induction of defences. White spot. *Zea Mays*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

- Figura 1 - Ilustração da semelhança entre as lesões iniciais da mancha branca do milho após inoculação artificial com *Pantoea ananatis* e lesões encontradas em infecção natural a campo no híbrido P1680YH. Santa Maria – RS 30
- Figura 2 - Ilustração da diferença entre as lesões e a severidade da *Pantoea ananatis* nos híbridos P1680YH, AG8780 e SUPREMO. Santa Maria – RS.. 32

CAPÍTULO II

- Figura 1 - Condições climáticas de precipitação (mm) e temperatura média (°C) durante o experimento de campo. Santa Maria – RS.. 40
- Figura 2 - Curvas de progresso da severidade de *Pantoea ananatis* no milho dos tratamentos testados. Santa Maria – RS..... 45
- Figura 3 - Curvas de progresso da severidade de *Pantoea ananatis* no milho dos tratamentos sem as combinações com *Azospirillum brasilense* e Silício. Santa Maria – RS 46
- Figura 4 - Ilustração da diferença da severidade da mancha branca do milho entre os tratamentos, pelas folhas da espiga coletadas aos 60 dias após a primeira aplicação via foliar. Santa Maria – RS.. 48
- Figura 5 – Comportamento das curvas de progresso da mancha branca do milho do controle químico ciproconazol + picoxistrobina, associado ou não *Azospirillum brasilense*, via tratamento de sementes, da testemunha e precipitação diária (mm) durante o experimento a campo. Santa Maria – RS.....50
- Figura 6 - Comportamento da curva de progresso da mancha branca do milho sem controle químico em resposta as condições climáticas de temperatura (°C) e precipitação (mm). Santa Maria – RS..... 52
- Figura 7 - Sensibilidade de *Pantoea ananatis* as diferentes concentrações dos ingredientes ativos ciproconazol, picoxistrobina, casugamicina e mancozebe. Santa Maria – RS 53

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados com dose e forma de aplicação de silício e *A. brasilense* na redução da severidade da *Pantoea ananatis* em milho..... 28
- Tabela 2 - Resumo da análise da variância conjunta dos fatores dos indutores de defesa (Silício e *Azospirillum brasilense*) e dos híbridos, para severidade da *P. ananatis*. Santa Maria – RS..... 31
- Tabela 3 - Médias da severidade (%) da mancha branca do milho na combinação dos fatores, híbridos x indutores de defesa. Santa Maria – RS..... 31

CAPÍTULO II

- Tabela 1.- Descrição dos tratamentos utilizados no experimento a campo, com ingredientes ativos (i.a.) e doses dos produtos químicos e indutores de defesas testados. Santa Maria – RS..... 43
- Tabela 2 - Concentrações dos meios de cultura em parte por milhão (PPM) dos ingredientes ativos, formados para avaliar a sensibilidade in vitro da *Pantoea ananatis*. 44
- Tabela 3 - Área abaixo da curva de progresso e produtividade de grãos de milho. Santa Maria – RS..... 47
- Tabela 4 - Contrastes ortogonais entre os grupos de tratamentos e suas estimativas para AACPD e produtividade. Santa Maria – RS. 49
- Tabela 5 - Equações das regressões, ED50 e sensibilidade da *Pantoea ananatis* aos ingredientes ativos e as suas concentrações utilizadas na calda de pulverização do experimento de campo. Santa Maria – RS. 54

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO: PATOSSISTEMA | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 | MANCHA BRANCA DO MILHO: <i>Pantoea ananatis</i> | 16 |
| 2.1.1 | Impacto da doença sobre a cultura do milho | 16 |
| 2.1.2 | Sintomatologia | 17 |
| 2.1.3 | Etiologia | 17 |
| 2.1.4 | <i>Pantoea ananatis</i> | 18 |
| 2.1.5 | Manejo da doença | 19 |
| 2.2 | INDUTORES DE DEFESAS | 19 |
| 2.2.1 | <i>Azospirillum brasilense</i> | 20 |
| 2.2.2 | Silício | 21 |

CAPÍTULO I

SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* NA REDUÇÃO DA SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis* EM HIBRÍDOS DE MILHO

| | | |
|----------|---------------------------------------------|--------------------------------------|
| 3 | INTRODUÇÃO | 25 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 | LOCAL E ÉPOCA DO EXPERIMENTO..... | 27 |
| 4.2 | OBTENÇÃO DO ISOLADO..... | 27 |
| 4.3 | TESTE DE PATOGENICIDADE..... | 27 |
| 4.4 | EXPERIMENTO..... | 27 |
| 4.5 | INOCULAÇÃO DE <i>Pantoea ananatis</i> | 28 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA | 29 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 30 |
| 5.1 | PATOGENECIDADE de <i>P. ananatis</i> | 30 |
| 5.2 | SEVERIDADE DA <i>P. ananatis</i> | Erro! Indicador não definido. |
| 6 | CONCLUSÃO | 33 |
| 7 | REFERÊNCIAS | 34 |

CAPÍTULO II
CONTROLE QUIMÍCO DE *Pantoea ananatis*, ASSOCIADO AO SÍLCIO E
Azospirillum brasilense

| | | |
|-----------|------------------------------------------------|-----------|
| 8 | INTRODUÇÃO | 38 |
| 9 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 40 |
| 9.1 | EXPERIMENTO DE CAMPO | 40 |
| 9.1.1 | Local e época de semeadura do experimento..... | 40 |
| 9.1.2 | Manejo e híbrido..... | 41 |
| 9.1.3 | Tratamentos..... | 41 |
| 9.1.4 | Avaliação e análise estatística..... | 42 |
| 9.2 | EXPERIMENTO DE SENSIBILIDADE IN VITRO | 43 |
| 9.2.1 | Local e época do experimento | 43 |
| 9.2.2 | Obtenção do isolado..... | 43 |
| 9.2.3 | Produtos químicos | 43 |
| 9.2.4 | Concentrações avaliadas | 43 |
| 9.2.5 | Inoculação de <i>Pantoea ananatis</i> | 44 |
| 9.2.6 | Delineamento e análise estatística | 44 |
| 10 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 45 |
| 10.1 | EXPERIMENTO DE CAMPO | 45 |
| 10.1.1 | Severidade e curva de progresso da MBM | 45 |
| 10.1.2 | Produtividade e AACPD da MBM..... | 46 |
| 10.2 | EXPERIMENTO DE SENSIBILIDADE IN VITRO | 53 |
| 11 | CONCLUSÃO | 56 |
| 12 | REFERÊNCIAS | 57 |
| 13 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 60 |
| 14 | REFERÊNCIAS | 61 |

1 INTRODUÇÃO: PATOSSISTEMA

O milho (*Zea mays*) é uma das culturas de maior expressão no cenário agrícola brasileiro, sendo a segunda principal *commoditie* produzida no país e a principal fonte de carboidratos utilizados na alimentação animal. A partir do ano agrícola de 1998/1999 o cultivo da cultura da soja, realizado principalmente durante os meses de outubro, novembro e dezembro (primeira safra), expandiu ocupando áreas de produção da cultura do milho.

A área cultivada de milho é atualmente de 17.000 mil hectares, sendo 70% cultivada durante o período de segunda safra. A migração do período de cultivo do milho associado os sistemas de produção atuais, como a utilização de cultivares mais produtiva, porém mais suscetíveis a doenças, maiores populações de planta, sistemas de irrigação, sistema plantio direto, sucessão de culturas, tem proporcionado condições favoráveis para o aumento da severidade de doenças na cultura do milho.

Entre as doenças que afetam a cultura destaca-se o patossistema da mancha branca do milho (MBM), que adquiriu caráter endêmico em diversas regiões produtoras do país, podendo provocar perdas de até 60% da produtividade de grãos. O agente etiológico da MBM atualmente é descrito pela bactéria *Pantoea ananatis*, entretanto as lesões pré-estabelecidas pela bactéria podem ser colonizadas por fungos oportunistas.

Os sintomas da MBM são caracterizados por pequenas lesões circulares inicialmente verde pálida que progridem para lesões circulares necróticas, de coloração esbranquiçada, podendo medir até 0,3 cm a 1,0 cm de diâmetro. O controle genético, com a utilização de híbridos resistentes é principal forma de controle da MBM, porém muitos produtores ainda utilizam híbridos suscetíveis por serem mais produtivos, tornando necessário o manejo químico da doença.

Por isso é necessário conhecer a eficácia dos produtos químicos, além de buscar alternativas de controle da doença. Como, a indução de defesas da cultura, já que a exposição de agentes bióticos (não patogênicos) e abióticos pode levar a resistência sistêmica induzida (RSI) das plantas, pela ativação de mecanismos de resistência latentes.

O silício apresenta vários relatos de indução de defesas e redução da severidade de diversas relações patógeno x hospedeiro. A bactéria *Azospirillum brasilense*, atualmente utilizada como inoculante em milho, proporciona fixação de nitrogênio e produção de

hormônios de crescimento para cultura, entretanto, também promove a indução de defesas do milho.

Contudo, não há relatos na literatura do uso de silício e *Azospirillum brasilense*, na cultura do milho, para redução da severidade da MBM. Nesse contexto, a utilização dos possíveis indutores de defesa, silício e *Azospirillum brasilense*, pode ser uma importante ferramenta no controle da mancha branca do milho, além de auxiliar o controle químico da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MANCHA BRANCA DO MILHO: *Pantoea ananatis*

2.1.1 Impacto da doença sobre a cultura do milho

A partir do ano agrícola de 1998/1999 o cultivo da cultura da soja, realizado principalmente durante os meses de outubro, novembro e dezembro (primeira safra), expandiu ocupando áreas de produção da cultura do milho, que acabou migrando para o cultivo no período da segunda safra (CONAB 2018b).

Atualmente no ano agrícola de 2017/2018, durante 1º e 2º safras, estimam-se aproximadamente 17.000 mil hectares de área plantada de milho, o que corresponde a uma produção de 92.000 mil toneladas de grão, sendo 70% da área plantada durante o período de segunda safra (CONAB, 2018a).

Neste contexto, a expansão e migração da cadeia produtiva da cultura do milho, frente a cultura da soja, pelo aumento da área de cultivo no período de segunda safra, associados a maior densidade de plantas, menor espaçamento entre plantas, adoção do sistema de plantio direto, sistemas de irrigação, uso de híbridos suscetíveis e ausência de rotação de culturas, têm possibilitado a manutenção de inóculo, condições edafoclimáticas e micro clima que favorecem o aumento da incidência e severidade das doenças na cultura (CONAB, 2018b; PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006).

Entre as doenças que afetam a cultura do milho, destaca-se o patossistema da mancha branca do milho (MBM), que adquiriu caráter endêmico em diversas regiões produtoras do país. Em condições de elevada severidade da doença, as perdas podem ser de até 60% da produtividade de grãos (BRITO et al., 2013).

Severidades de MBM entre 10 e 20% podem reduzir até 40% da taxa fotossintética líquida e as perdas produtivas podem chegar a até 60% dependendo das condições ambientais (GODOY; AMORIM; FILHO, 2001). Umidade relativa do ar acima de 60% e temperaturas noturnas baixas (14 °C), são condições comuns em cultivos tardios (segunda safra) e em regiões com altitudes maiores que 600 metros. Essas condições são ideais para o desenvolvimento da doença (JULIATTI, 2014).

2.1.2 Sintomatologia

Os sintomas característicos da MBM apresentam-se inicialmente por lesões anasarcas circulares pequenas, de coloração verde pálida. No decorrer do tempo, as lesões evoluem chegando a medir de 0,3 a 1,0 cm de diâmetro, tornando-se lesões circulares ou elípticas de coloração esbranquiçada, necróticas e secas (OLIVEIRA et al., 2004).

As lesões provocadas pela MBM reduzem a área fotossintetizante ativa da cultura do milho, reduzindo a fotossíntese líquida e conseqüentemente a produtividade da cultura (GODOY; AMORIM; FILHO, 2001). Em condições favoráveis com elevada severidade da MBM os sintomas também podem ser observados na palha das espigas, além de encurtar o ciclo da cultura, pela senescência prematura das folhas, reduzindo o tamanho e massa dos grãos (OLIVEIRA et al., 2004).

2.1.3 Etiologia

A MBM foi descrita pela primeira vez por Rane; Payak; Renfro (1966) na Índia, tendo como agente causal o fungo ascomiceto *Phaeosphaeria maydis* e confirmado por Carson; Goodman; Glawe (1991) e Carson (2005) nos EUA e Fantin (1997) no Brasil. Entretanto, diversos autores questionam essa etiologia, devido à dificuldade do isolamento e realização dos postulados de Koch de *P. maydis* (LANZA, 2013).

Várias outras espécies já foram isoladas e identificadas (*Phyllosticta* sp., *Phoma* sp., *P. sorghina*, e *Sporormiella* sp.) a partir de lesões da MBM. Porém, quando inoculadas, não apresentaram sintomatologia parecida com a doença (AMARAL et al., 2004; AMARAL, 2005; CERVELATTI et al., 2002; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

Paccola-Meirelles (2001) identificou a bactéria *Pantoea ananatis*, isolada a partir de lesões iniciais de MBM, fato que iniciou o desenvolvimento de diversas pesquisas que descrevem a bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da MBM. Bomfeti et al. (2008) por meio de microscopia eletrônica de transmissão e técnicas moleculares, observou um grande número de células bacterianas nos espaços intercelulares em lesões iniciais da MBM, não tendo encontrado estruturas fungicas.

Após extração de DNA de lesões iniciais e avançadas da MBM, com auxílio de primers bacterianos (16S rRNA e rpoB) e oligonucleotídeos universais (ITS4) para fungos, a

amplificação a partir de lesões iniciais foi positiva somente para os primers bacterianos, enquanto nas lesões em estágio avançado a ampliação para o ITS4 foi observada, caracterizando que espécies fungicas podem colonizar as lesões da MBM, pré-estabelecidas pela bactéria *P. ananatis* (BOMFETI et al., 2008).

Lanza et al. (2013) isolou *P. ananatis* e *P. maydis* para verificar a patogenicidade desses agentes em plantas de milho, a inoculação do isolado de *P. ananatis* resultou no aparecimento de sintomas característicos da doença, enquanto que a inoculação do isolado de *P. maydis* não reproduziu os sintomas da MBM, evidenciando que o agente causador da MBM seja a bactéria *P. ananatis*.

A redução em aproximadamente 90% do número de lesões foliares da MBM, após a aplicação do antibiótico oxitetraciclina, à campo, associado a redução do crescimento de *P. ananatis* cultivada em laboratório na presença do mesmo antibiótico, também indicam que a bactéria *Pantoea ananatis* é o agente causal da MBM (PEDRO et al., 2013).

2.1.4 *Pantoea ananatis*

A bactéria *P. ananatis*, aeróbia facultativa e gran negativa, é caracterizada *in vitro* por colônias mucoides, não esporulantes, de coloração amarelo brilhante (PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001). É uma espécie oportunista, capaz de sobreviver de forma epífita, endofítica ou como um saprófita natural em diversos hospedeiros ou locais, sendo uma fonte de inóculo para hospedeiros suscetíveis (COUTINHO; VENTER, 2009).

A *P. ananatis* já foi descrita causando doença em diversas culturas agrícolas e plantas daninhas, que podem ser fonte de inóculo para cultura do milho, como: arroz (COTHER, 2004); alho (GITAITIS et al., 2002); capim sudão (*Sorghum sudanense* L.) (AZAD, 2000); e capim colchão (*Digitaria horizontalis*) (GOLÇALVES et al., 2010).

Antes de infectar as plantas de milho, a *P. ananatis* pode sobreviver epífitamente sobre a superfície das folhas, até que atinja uma concentração de células suficiente e, em condições ambientais favoráveis, resultando na infecção e aparecimento de sintomas da MBM (SAUER et al., 2010).

A *P. ananatis* produz uma substância sinalizadora denominada acil-homoserina lactona, que permite que a população da bactéria se comunique por um mecanismo chamado *quorum-sensing*. Ou seja, é necessária uma determinada concentração da substância sinalizadora,

produzida por uma população de bactérias, para expressão de caracteres fenotípicos importantes no ataque e defesa do patógeno ao hospedeiro (POMINI; ARAUJO; MARSAIOLI, 2006).

Um mecanismo importante na infecção da bactéria *P. ananatis*, em hospedeiros sensíveis ao congelamento no meio intracelular, como a cultura do milho, é a formação cristais de gelo, fenômeno denominado de nucleação de gelo, capaz de romper a parede celular e membrana plasmática das células, característico em lesões anasarcas da MBM na cultura do milho (SAUER et al., 2014).

2.1.5 Manejo da doença

Atualmente o controle genético, com a utilização de híbridos resistentes, é a principal forma de controle da MBM (LOPES et al., 2007). Porém, apesar dos riscos de perdas na produção, os produtores ainda utilizam híbridos suscetíveis, por serem mais produtivos, tornando indispensável o manejo das doenças do milho, com a utilização de produtos químicos como fungicidas e antibióticos (MANERBA et al., 2013).

A eficácia de controle da MBM pelas aplicações de fungicida mancozebe, em dois estádios (V6 - seis folhas expandias e/ou pré-pendoamento), demonstraram uma interação significativa entre híbridos com diferentes suscetibilidades a doença. Nos híbridos suscetíveis a menor área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi observada com duas aplicações de mancozebe, enquanto que a aplicação de mancozebe não resultou em diferença significativa na AACPD dos híbridos resistentes (PEREIRA et al., 2012).

Os antibióticos oxitetraciclina e estreptomicina apresentam um controle significativo da MBM. Porém inferior ao tratamento com o fungicida protetor mancozebe (MANERBA et al., 2013). A aplicação do fungicida sistêmicos azoxistrobina + ciproconazol resultou na maior produtividade da cultura, entretanto, a AACPD da MBM foi maior, quando comparado com o antibiótico casugamicina, o fungicida epoxiconazol + piraclostrobina, o cloreto de benzalcônio e um fermentado de *Penicillium* spp. (JULIATTI et al., 2014).

2.2 INDUTORES DE DEFESAS

Atualmente, é crescente a preocupação com a proteção de plantas e com a segurança alimentar, associado a redução do uso de produtos químicos. Em função disto, pesquisadores

buscam alternativas no controle de doenças, como a indução de defesas de plantas. As plantas apresentam naturalmente mecanismos de defesa, estruturais e bioquímicos. Estas podem estar pré-formados (basais) ou ser formados após o contato entre o patógeno ou indutor com o hospedeiro (induzidas) (BEKTAS; EULGEM, 2015).

Os mecanismos estruturais são caracterizados pela formação de barreiras físicas à penetração e colonização do patógeno nos vegetais. Os mecanismos bioquímicos abrangem uma série de substâncias capazes de inibir o desenvolvimento do patógeno e fazem parte do sistema imunológico dos vegetais. A ativação do sistema imunológico é controlada pelos genes do hospedeiro, que reconhece os eleitores do patógeno ou substâncias indutoras de defesas (GARCION et al., 2007; SCHWAN-ESTRADA et al., 2008).

Assim a exposição à agentes bióticos (microrganismos não patogênicos, como inoculantes) e abióticos (proteínas; polissacarídeos, fitohormônios, aminoácidos e nutrientes, como fósforo, potássio e silício), podem induzir a produção das defesas das plantas, promovendo a resistência das plantas a diversos agentes patogênicos (REGLINSKI; DANN; DEVERALL, 2014).

2.2.1 *Azospirillum brasilense*

No entorno das raízes das plantas se forma a rizosfera, composta de uma comunidade de microrganismos que se aproveitam dos exsudatos das plantas. Alguns destes microrganismos podem produzir substâncias promotoras de crescimento, como fitohormônios, além de diminuir e prevenir o efeito deletério de fitopatógenos (BENEDUZI; AMBROSINI; PASSAGLIA, 2012).

A bactéria *Azospirillum brasilense*, devido a uma variedade de mecanismos, como fixação de nitrogênio (N₂) atmosférico, produção de fitohormônios e redução de nitrato e fosfato, é utilizada como inoculante, promovendo o crescimento de plantas, principalmente nas culturas do milho, arroz e trigo (AMBROSINI; SOUZA; PASSAGLIA, 2016).

Na cultura do milho a utilização de *Azospirillum brasilense* altera o metabolismo e a morfologia das plantas, através do aumento na produção de raízes, pelo desenvolvimento de pelos radiculares, que melhoram a absorção de água e nutrientes (SAIKIA et al., 2012; BASHAN; HOLGUIN; BASHAN, 2004). Consequentemente, a utilização de *Azospirillum brasilense* em tratamento de sementes promove maior altura de planta, diâmetro de caule, índice

de clorofila, massa seca de caule e raiz, peso de mil grãos e rendimento de grãos de milho (COSTA et al., 2015).

Diversos autores relataram uma maior produtividade do milho com a utilização de *Azospirillum brasilense*, com aumento de rendimento de grãos em uma faixa de 6 a 27% (BARTCHECHEN et al., 2010; BRACCINI et al., 2012; HUNGRIA et al., 2010; KAPPES et al., 2013; LANA et al., 2012; MAZZUCHELLI et al., 2014; PORTUGAL; PERES; GARÉ, 2016).

Embora, não hajam relatos na redução da severidade ou incidência de doenças na cultura do milho, a utilização de *A. brasilense* em tomate promoveu a redução da incidência de *Rhizoctonia solani* e *Pseudomonas syringae* pv., sob baixa pressão de inóculo, podendo estar associado a supressão dos patógenos ou a indução de defesas da cultura (BASHAN; DE-BASHAN, 2002; GUPTA; ARORA; SRIVASTAVA, 1995).

A interação entre as células do tomate e *Azospirillum* sp. resultaram na ativação do sistema imunológico das plantas, reduzindo o tamanho das lesões de *Botrytis cinerea* (FUGITA et al., 2017). *A. brasilense* também reduziu a severidade de plantas de arroz a *Piricularia oryzae*. Entretanto, ainda não estão definidos quais os mecanismos de defesa induzidos (YASUDA et al., 2009).

Fukami et al. (2017) avaliou os efeitos da aplicação de *A. brasilense*, sobre a indução de tolerância ao estresse vegetal e genes de defesa do milho, utilizando as cepas Ab-V5 e Ab-V6, via tratamento de sementes e pulverização. A inoculação com *A. brasilense* em plantas de milho, resultou na regulação dos genes relacionados ao estresse oxidativo e genes relacionados a patogênese, como *PR1* e *prp4*, aumentando a resistência das plantas de milho ao estresse biótico e abiótico.

2.2.2 Silício

O silício (Si) é o segundo elemento mais abundante e compreende até 70% da massa do solo. Porém, não é considerado um elemento essencial para desenvolvimento das plantas. (MA; YAMAJI, 2006) Geralmente o silício é absorvido na forma de ácido silício (Si(OH)_4), com auxílio dos transportadores de membrana plasmática *Lsi1* e *Lsi2* (MA; YAMAJI, 2006; MA et al., 2006, 2007, 2008). O acúmulo de Si em plantas promove diversos efeitos benéficos a diversas espécies, principalmente em dicotiledôneas (EPSTEIN, 1994).

Silício, como indutor de defesas das plantas, foi descoberto nos anos 60, desde então são relatados as supressões de diversas doenças, como: *Piricularia oryzae* e *Bipolaris oryzae* em arroz (SANTOS et al., 2003; ZANÃO JÚNIOR et al., 2009), *Cercospora coffeicola* em café (POZZA et al., 2004) e *Puccinia melanocephala* e *Leptosphaeria sacchari* em cana-de-açúcar (DEAN; TODD, 1979; RAID; ANDERSON; ULLOA, 1992).

A aplicação de silício na cultura do milho propicia a resistência das plantas à lagarta *Spodoptera frugiperda* (GOUSSAIN et al., 2002). Porém, não há trabalhos avaliando a utilização do silício na redução da severidade de doenças na cultura do milho.

As respostas de defesa de plantas mediadas pelo silício são uma combinação de mecanismo físicos, bioquímicos e moleculares. O silício promove a formação de uma barreira física de pré-infecção, através do acúmulo de silício na parede celular das culturas, pela salificação das células e formação de uma dupla camada de cutícula-sílica, que dificulta a penetração dos patógenos, além de barreiras pós- infecção, pelo reforço da parede celular e formação de papilas no local da infecção (PEREIRA et al., 2009; RODRIGUES et al., 2003; SILVA et al., 2012).

Além disso, o silício atua como sinalizador que induz a formação de barreiras bioquímicas, como, a formação de compostos fenólicos e aumento da atividade de enzimas de defesa, quitinases, β -1,3-glucanases, peroxidases, polifenoloxidasas, lipoxigenases e fenilalanina amônia-liases. Durante a interação patógeno-hospedeiro, o silício atua em nível molecular, regulando a expressão de genes envolvidos nas respostas de defesa (SILVA et al., 2012; WANG et al., 2017).

CAPÍTULO I

SILÍCIO E *Azospirillum brasilense* NA REDUÇÃO DA SEVERIDADE DE *Pantoea ananatis* EM HÍBRIDOS DE MILHO

RESUMO

A mancha branca do milho (MBM) (*Pantoea ananatis*) é a principal doença da cultura e em condições severas reduz significativamente a produtividade. A utilização de agentes bióticos e abióticos pode induzir defesas nas plantas. Há relatos na literatura em que o silício e *Azospirillum brasilense* induzem as defesas das plantas. Nesse contexto, induzir as defesas das plantas de milho pode ser uma alternativa para a redução da MBM. O objetivo do trabalho foi avaliar os indutores de defesa, silício e *Azospirillum brasilense*, na redução da severidade da MBM. Os experimentos foram realizados em casa-de-vegetação, em bifatorial 7 x 3. O fator dos indutores de defesas foi formado por duas doses de silício aplicado via foliar (2,0 e 4,0 l ha⁻¹ de silicato de potássio) e quatro doses de *Azospirillum brasilense*, também aplicado via foliar (300 e 600 ml ha⁻¹) e via tratamento de semente (150 e 300 ml ha⁻¹), além de uma testemunha. O fator dos híbridos foi formado por três híbridos de milho suscetíveis (P1680YH, AG8780 e SUPREMO). A bactéria *Pantoea ananatis* foi inoculada por pulverização sete dias após a aplicação indutores. A avaliação foi realizada uma semana após a inoculação, pela contagem de lesões na folha inoculada e os dados foram transformados para severidade. A interação entre os fatores foi significativa, pois os híbridos AG8780 e SUPREMO não apresentam diferença significativa entre os níveis dos indutores de defesa. Enquanto no híbrido P1680YH os tratamentos com silício e *Azospirillum brasilense* reduziram significativamente a severidade da *Pantoea ananatis*.

Palavras-chave: Indução de defesas. Doença. Mancha branca do milho. Severidade. Zea Mays.

CAPÍTULO I

SILICON AND *Azospirillum brasilense* IN THE REDUCTION OF *Pantoea ananatis* SEVERITY IN CORN HIBRIDES

ABSTRACT

The maize white spot (MWS) (*Pantoea ananatis*) is the main disease of the crop and in severe conditions it significantly reduces yield. The use of biotic and abiotic agents can induce plant defences. There are reports in the literature in which silicon and *Azospirillum brasilense* induce plant defences. In this context, inducing the defences of maize plants may be an alternative for reducing MWS. The objective of this study was to evaluate the defines inducers, silicon and *Azospirillum brasilense*, in reducing the severity of MWS. The experiments were carried out in greenhouse, in a 7 x 3 factorial. The factor of the defensive inducers was formed by two doses of silicon applied by leaf (2.0 and 4.0 l ha⁻¹ of potassium silicate) and four doses of *Azospirillum brasilense*, also applied via foliar (300 and 600 ml ha⁻¹) and via seed treatment (150 and 300 ml ha⁻¹), in addition to a control. The hybrids factor was formed by three susceptible maize hybrids (P1680YH, AG8780 and SUPREMO). The bacterium *Pantoea ananatis* was inoculated by spraying seven days after the application of inducers. The evaluation was performed one week after inoculation by counting lesions in the inoculated leaf and the date were transformed to severity. The interaction between the factors was significant, since the AG8780 and SUPREMO hybrids did not present significant difference between the levels of the defence inducers. While in the hybrid P1680YH the treatments with silicon and *Azospirillum brasilense* significantly reduced the severity of *Pantoea ananatis*.

Key-words: Induction of defences. Disease. White corn spot. Severity. Zea mays.

3 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.) é uma das principais culturas no cenário agrícola brasileiro e segundo CONAB (2018) a área cultivada estimada, na safra 2017/2018, é de aproximadamente 17.000 mil hectares, entretanto, devido ao aumento do cultivo da cultura soja na época de primeira safra, atualmente 70% do cultivo do milho passou a ser realizado no período da segunda safra.

A mudança no período de cultivo do milho, associado ao manejo atual da cultura, como, maiores populações de plantas, uso do sistema de plantio direto, híbridos de milho suscetíveis e sistemas de irrigação, proporcionou a maior incidência e severidade das doenças na cultura. Essas condições garantem um hospedeiro suscetíveis, a manutenção dos inóculos e um ambiente favoráveis ao desenvolvimento das doenças (PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006).

A mancha branca do milho (MBM) é a principal doença na cultura do milho e adquiriu caráter endêmico em diversas regiões produtoras do país, podendo reduzir em até 60% a produtividade de grãos (BRITO et al., 2013). A MBM é causada pela bactéria *Pantoea ananatis*, entretanto, diversas espécies de fungos oportunistas (*Phaeosphaeria maydis*, *Phyllosticta* sp., *Phoma* sp., *P. sorghina*, e *Sporormiella* sp.) podem colonizar lesões pré-estabelecida pela bactéria (LANZA et al., 2013; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

Os sintomas da MBM provocam a redução da área fotossintetizante ativa da cultura. São caracterizadas inicialmente por lesões anasarcas circulares, pequenas e de coloração verde pálida, ao decorrer do tempo, evoluem tornando-se lesões circulares ou elípticas de coloração esbranquiçada, necróticas e secas, com 0,3 a 1,0 cm de diâmetro (OLIVEIRA et al., 2004).

A utilização de híbridos com elevado potencial produtivo, porém, suscetíveis a MBM, torna necessário a proteção das plantas, para manutenção da produtividade da cultura. Neste contexto, é fundamental o estudo de alternativas de controle, visando a sustentabilidade ecológica, segurança alimentar e redução do uso de produtos químicos na proteção das culturas.

Pois a exposição à agente bióticos ou abióticos, podem induzir a produção das defesas das plantas (REGLINSKI; DANN; DEVERALL, 2014). Os indutores de defesa desencadeiam uma série de mecanismos de defesa que resultam na maior proteção das culturas diversos agentes patogênicos (GOZOO; FAORO, 2013).

Existem diversos estudos que relatam o silício e *Azospirillum brasilense* como potenciais de indutores de defesas em diversas culturas (POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015;

ROMERO et al., 2003). Entretanto, não há relatos na literatura do uso de silício e *Azospirillum brasilense* na redução da severidade da MBM em milho.

Os efeitos benéficos do silício na indução das defesas das plantas às doenças causadas por fungos e bactérias são mediados por uma combinação de mecanismos físicos, bioquímicas e moleculares (POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015; WANG et al, 2017).

A bactéria *Azospirillum brasilense*, atualmente utilizada como inoculante em milho, proporciona fixação de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento, resultando em aumento da produtividade de grãos (AMBROSINI; SOUZA; PASSAGLIA, 2016). Além disto, a inoculação com *A. brasilense* em plantas de milho resultou na regulação de genes relacionados ao estresse oxidativo e genes relacionados a patogênese, como *PR1* e *prp4*, aumentando a resistência das plantas de milho ao estresse biótico e abiótico (FUKAMI et al. 2017).

Nesse contexto a utilização de indutores de defesa, como silício e *Azospirillum brasilense*, podem apresentar uma importante ferramenta no controle da *Pantoea ananatis* na cultura do milho.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL E ÉPOCA DO EXPERIMENTO

O experimento foi conduzido em etapas. Primeiramente, se realizou o isolamento, a manipulação e a multiplicação do inóculo de *P. ananatis* no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Posteriormente, o experimento foi conduzido na casa de vegetação do Departamento de Defesa Fitossanitária da UFSM, com temperatura controlada em 25 °C, no último semestre de 2017.

4.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO

O isolado de *P. ananatis* foi obtido a partir da coleta de folhas de milho que apresentaram os sintomas iniciais da doença, em uma lavoura comercial no município de Jóia – RS. Posteriormente, o material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As lesões iniciais da MBM foram destacadas das folhas, para posterior desinfecção e cultivo em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), onde foram mantidas em câmara de crescimento (BOD), a 30° C por 48 horas. Após crescimento das colônias, o patógeno foi identificado como *P. ananatis* e repicado.

4.3 TESTE DE PATOGENICIDADE

Para confirmar o isolamento e a patogenicidade da bactéria *Pantoea ananatis*, foi realizada a inoculação, via pulverização, de uma suspensão do patógeno no híbrido P1680YH, suscetível a MBM, a fim de avaliar o desenvolvimento das lesões características da doença. A suspensão foi preparada pela raspagem das colônias cultivadas em meio BDA, em câmara de crescimento (BOD), a 30° C por 48 horas, utilizando uma solução salina de 0,85% NaCl.

4.4 EXPERIMENTO

As unidades experimentais (UEs) foram constituídas por vasos (5,0 L), preenchidos com substrato estéril, da marca comercial MECPLANT®, contendo duas plantas de milho, semanalmente submetidas ao rodízio aleatório. Com delineamento inteiramente casualizado e

quatro repetições, se formou um bifatorial 7 x 3, onde o fator A representou os níveis dos indutores de defesa e o fator D os híbridos avaliados.

O fator D foi formado com 3 híbridos de milho suscetíveis a MBM, o P1680YH, AG8780 e SUPREMO. O fator A foi formado pela aplicação de silício e *Azospirillum brasilense* em doses e formas diferentes, segundo a tabela 1.

Tabela 1 - Descrição dos tratamentos utilizados com dose e forma de aplicação de silício e *A. brasilense* na redução da severidade da *Pantoea ananatis* em milho.

| TRAT. | INDUTORES DE DEFESAS | DOSE | APLICAÇÃO |
|-------|----------------------|-------------------------|------------------------|
| 1 | Testemunha | - | - |
| 2 | <i>A. brasilense</i> | 150 ml/ 50 kg | Tratamento de sementes |
| 3 | <i>A. brasilense</i> | 300 ml/ 50 kg | Tratamento de sementes |
| 4 | <i>A. brasilense</i> | 300 ml ha ⁻¹ | Pulverização |
| 5 | <i>A. brasilense</i> | 600 ml ha ⁻¹ | Pulverização |
| 6 | Silício | 2,0 L ha ⁻¹ | Pulverização |
| 7 | Silício | 4,0 Lha ⁻¹ | Pulverização |

Os tratamentos com silício foram formados pela aplicação de silicato de potássio com produto da marca comercial Supa Silica[®], com concentração de 20% de silício. Os tratamentos com *A. brasilense* foram efetuados pela aplicação do produto com marca comercial AzoTotal Max[®], com 2x10⁸ UFC ml⁻¹ das estirpes abv5 e abv6 de *A. brasilense*.

As aplicações via tratamento de sementes (TS) com *Azospirillum brasilense* foram realizadas previamente a semeadura, em ambiente climatizado à 23° C, enquanto as aplicações via pulverização foram realizadas, na casa de vegetação, uma semana antes da inoculação, aos 18 dias após a emergência, utilizando um aparelho costal à CO₂, com pressão constante de 40 libras pol⁻², totalizando um volume de calda de 150 l ha⁻¹.

4.5 INOCULAÇÃO DE *Pantoea ananatis*

A inoculação do patógeno foi realizada no mesmo dia para todos os híbridos, quando as plantas de milho apresentavam 25 dias de desenvolvimento após a emergência. Previamente foi realizada uma raspagem na face abaxial da última folha expandida do milho, utilizando uma esponja multiuso nova. Em seguida foi pulverizada uma suspensão de inóculo de *P. ananatis*.

A suspensão foi preparada pela raspagem das colônias cultivadas em meio BDA, em câmara de crescimento (BOD), a 30° C por 48 horas, utilizando uma solução salina de 0,85% NaCl. A concentração obtida na solução foi quantificada através de uma diluição seriada e posterior inoculação em placas com BDA, para contagem das unidades formadoras de colônias (UFCs) (adaptado LANZA, et al. 2013). A suspensão formada totalizou $6,04 \times 10^8$ UFC ml⁻¹ de *Pantoea ananatis*.

4.6 AVALIAÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA

As avaliações foram realizadas, com auxílio de um demarcador de 200 cm², pela contagem e medição das lesões provocadas por *P. ananatis*, nas folhas inoculadas. Com o número e tamanho médio das lesões, em uma área conhecida, os dados obtidos foram transformados em severidade (%).

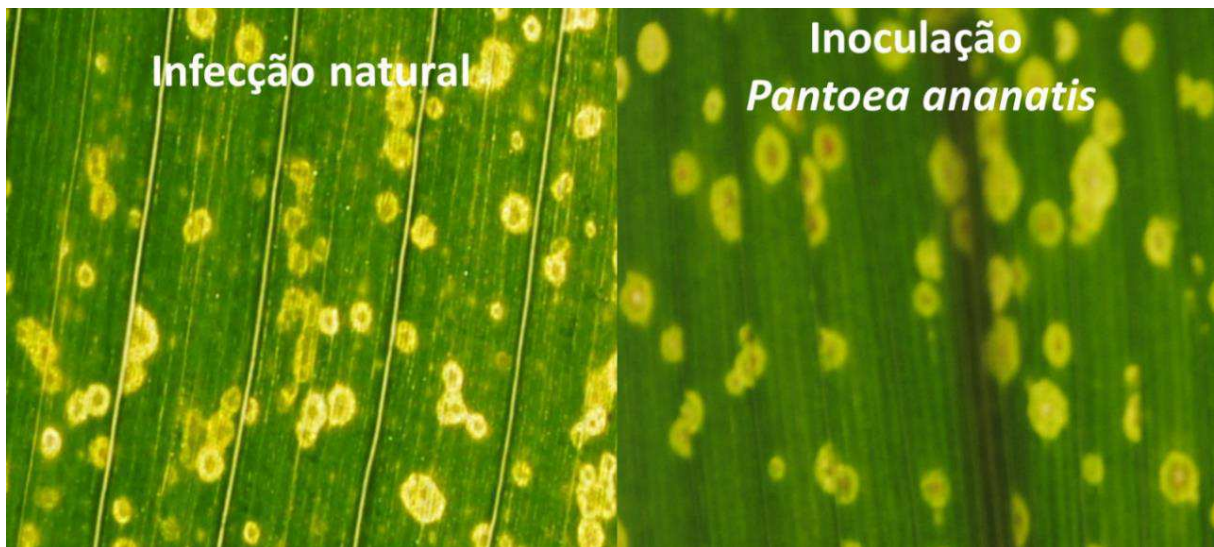
Os dados foram submetidos a análise de variância individual ($p < 0,05$), em esquema fatorial, indutores (7) x híbridos (3). Os dados foram analisados, pelo teste F e posteriormente as médias dos tratamentos foram separados pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PATOGENECIDADE de *P. ananatis*

A inoculação do isolado de *Pantoea ananatis* no híbrido P1680YH resultou em sintomatologia semelhante a lesões iniciais encontradas em infecção natural em condições de campo, figura 1.

Figura 1 – Ilustração da semelhança entre as lesões iniciais da mancha branca do milho, após inoculação artificial com *Pantoea ananatis* e lesões encontradas em infecção natural a campo, no híbrido P1680YH. Santa Maria – RS.



5.2 SEVERIDADE DA *P. ananatis*

A interação entre os níveis dos indutores de defesa (silício e *A. brasilense*) e híbridos, segundo a análise da variância, foi significativa para a severidade da *P. ananatis* (Tabela 2).

Tabela 2 – Resumo da análise da variância conjunta dos fatores dos indutores de defesa (Silício e *Azospirillum brasilense*) e dos híbridos, para severidade da *P. ananatis*. Santa Maria – RS.

| FV ¹ | G.L. ² | QM ³ | Fc | Pr>Fc |
|----------------------------------------|-------------------|-----------------|--------|-------|
| Indutores de defesas | 6 | 12478,60 | 24,71 | 0,00 |
| Híbridos | 2 | 493092,02 | 976,48 | 0,00 |
| Indutores de defesas x Híbridos | 12 | 10572,69 | 20,93 | 0,00 |
| Erro | 63 | 504,96 | | |
| C.V.⁴ | 24,66 | | | |

¹ Fonte de variação; ² Graus de liberdade; ³ Quadrado médio; e ⁴ Coeficiente de variação

O híbrido de milho P1680YH apresentou a maior severidade da *Pantoea ananatis*, em todos os níveis dos tratamentos com indutores de defesa, quando comparados aos demais híbridos. Enquanto, os híbridos AG8780 e SUPREMO apresentaram uma baixa suscetibilidade a inoculação deste isolado de *Pantoea ananatis*, não diferindo significativamente entre os níveis dos tratamentos com os indutores de defesas (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias da severidade (%) da mancha branca do milho na combinação dos fatores, híbridos x indutores de defesa. Santa Maria – RS.

| Indutores de defesa | Híbridos | | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------|---------|---------|
| | P1680YH | AG8780 | SUPREMO |
| Testemunha | 42,89 dB ³ | 3,55 aA | 0,91 aA |
| <i>A. brasilense</i> TS ¹ (150 ml/ 50 kg sem) | 33,97 cB | 2,9 aA | 0,86 aA |
| <i>A. brasilense</i> TS (300 ml/ 50 kg sem) | 30,01 bB | 2,11 aA | 0,31 aA |
| <i>A. brasilense</i> Foliar ² (0,3 l ha ⁻¹) | 41,25 dB | 2,26 aA | 1,40 aA |
| <i>A. brasilense</i> Foliar (0,6 l ha ⁻¹) | 36,17 cB | 3,11 aA | 2,48 aA |
| Silício (2,0 l ha⁻¹) | 15,07 aB | 2,10 aA | 1,11 aA |
| Silício (4,0 l ha⁻¹) | 17,27 aB | 1,95 aA | 0,60 aA |

¹Tratamento de sementes. ² Aplicação via foliar. ³ Médias seguidas pela letra minúscula se diferem entre as linhas e as letras maiúsculas se diferem entre as colunas pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade.

Para o híbrido P1680YH os tratamentos com silício, nas doses de 2,0 e 4,0 l ha⁻¹, resultaram na menor severidade da *P. ananatis*, reduzindo aproximadamente 60 % da severidade da doença. Assim, o silício pode ser utilizado na cultura do milho, como alternativa de controle da MBM, visto que, a cultura apresenta uma elevada absorção e acúmulo de silício, correspondendo de 0,5 a 0,7 % de silício na massa seca (ANDRADE et al., 2014).

O silício apresenta um papel importante auxiliando as plantas a superar estresses bióticos e abióticos. Pois, o acúmulo de silício nas plantas, possibilita, além da formação de uma barreira física na parede celular e cutícula, diversas respostas bioquímicas que promovem a indução das defesas das culturas (PEREIRA, et al. 2009; RODRIGUES, et al. 2003; SILVA, et al. 2012). O silício potencializa o metabolismo celular, atuando no controle de eventos de sinalização para a síntese de compostos antimicrobianos e como sinalizador regulando a expressão de genes de resposta ao estresse vegetal (WANG et al., 2017).

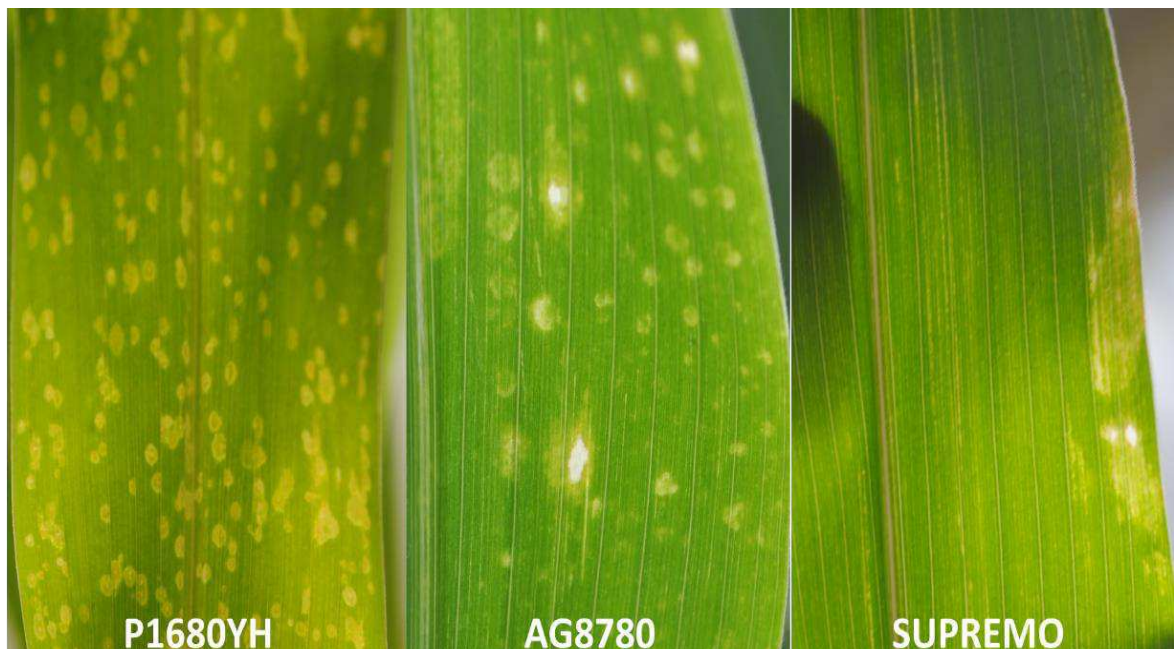
A aplicação de *A. brasilense*, via tratamento de sementes, na dose de 300 ml para 50 kg de sementes, reduziu em 30 % a severidade da doença, seguido pelos demais tratamentos com *A. brasilense*, aplicado via tratamento de semente e por pulverização via foliar, que também

reduziram a severidade da MBM. Resultados importantes, uma vez que, a bactéria *Azospirillum brasilense* é utilizada na cultura do milho como inoculante. Promovendo a fixação de nitrogênio (N₂) atmosférico, produção de fitohormônios e redução de nitrato e fosfato, que resultam em acréscimo na produtividade da cultura do milho em até 27 % (AMBROSINI; SOUZA; PASSAGLIA, 2016; PORTUGAL; PERES; GARÉ, 2016).

A redução da severidade da *Pantoea ananatis* em milho, pela aplicação de *A. brasilense* via tratamento de sementes ou via pulverização foliar, confirma os resultados de Fukami et al. (2017), onde a inoculação com *A. brasilense* em plantas de milho resultou na regulação de genes relacionados ao estresse oxidativo e genes relacionados a patogênese, como *PR1* e *prp4*, aumentando a resistência das plantas de milho ao estresse biótico e abiótico.

Os híbridos AG8780 e SUPREMO são caracterizados como suscetíveis a MBM. Porém, apresentaram tolerância no desenvolvimento das lesões da MBM, como visível na figura 3. Fato que pode estar relacionado com diferente suscetibilidade dos híbridos ao isolado testado.

Figura 2 – Ilustração da diferença entre as lesões e a severidade da *Pantoea ananatis* nos híbridos P1680YH, AG8780 e SUPREMO. Santa Maria – RS.



6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos indicam o silício e o *Azospirillum brasilense* como potenciais indutores de defesas e alternativa de controle da mancha branca do milho. Uma vez que o silício, aplicado via folia (2,0 e 4,0 l ha⁻¹), reduz em 60% a severidade da doença. E o *Azospirillum brasilense*, aplicado via tratamento de semente ou foliar, reduz em até 30 % a severidade da *Pantoea ananatis*.

O híbrido P1680YH, apresentou a maior severidade da MBM, quando comparado aos demais híbridos AG8780 e SUPREMO, que apresentaram uma baixa suscetibilidade ao isolado testado. A diferente sensibilidade dos híbridos (suscetíveis a MBM) ao isolado testado, pode servir como base para futuros estudos, que possam esclarecer a interação entre híbridos e isolados de *P. ananatis* obtidos de diferentes locais.

7 REFERÊNCIAS

- ANDRADE, F. A. et al. Accumulation of silicon and arrangement and shapes of silica bodies in corn leaves. **Genetics and Molecular Research**, n. 13, v. 1, p. 1690-1696, 2014.
- AMBROSINI, A.; SOUZA, R.; PASSAGLIA, L. M. P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant Soil**, v. 400, p. 193-207, 2016.
- BRITO, A. H. et al. Controle químico da Cercosporiose, Mancha-branca e dos Grãos Ardidos em milho. **Ceres**, v. 60, n. 5, p. 629-635, 2013.
- CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. n. 4, v. 5., Jan. 2018.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.
- FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, n. 7, v.153, 2017.
- GOZOO, F.; FAORO, F. Systemic Acquired Resistance (50 Years after Discovery): Moving from the Lab to the Field. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12473-12491, 2013.
- LANZA, F. E. et al. Etiology and epidemiological variables associated with maize resistance to white spot disease. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 349-359, 2013.
- OLIVEIRA, E. et al. The phaeosphaeria leaf spot of maize in brazil: evidences of a new ethiologic agente. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 3, p. 343-356, 2004.
- PACCOLA-MEIRELLES, L. D. et al. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal Phytopathology**, v. 149, p. 275-279, 2001.
- PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 164-170, 2009.
- PINTO, N. F. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 82 – 94, 2006.
- PORTUGUAL, J. R.; PERES, A.; GARÉ, L. M. *Azospirillum brasilense* promotes incremente in corn production. **African jornal of agricultural research**, v. 11, n. 19, p. 1688-1698, 2016.
- POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; BOTELHO, M. S. Silicon in plant disease control. **Ceres**, v. 62, n. 3, 2015.
- REGLINSKI, T.; DANN, E.; DEVERALL B. **Implementation of Induced Resistance for Crop Protection Induced Resistance for Plant Defense**. 2. ed., 2014.

RODRIGUES, F. A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicone-mediated rice blast resistance. **Phytopathology**, v. 93, p. 535-546, 2003.

ROMERO, A. M. et al. Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 832-838, 2003.

SILVA, M. R. J. et al. Silicon and manganese on the activity of enzymes involved in rice resistance against brown spot. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 5, p. 339-345, 2012.

WANG, M. et al. Role of Silicon on Plant-Pathogen Interactions. **Front. Plant Sci.**, v. 8, p. 701, 2017.

CAPÍTULO II

CONTROLE QUÍMICO DE *Pantoea ananatis*, ASSOCIADO AO SÍLCIO E *Azospirillum brasilense*

RESUMO

A mancha branca do milho (MBM) (*Pantoea ananatis*) é a principal doença do milho e em condições severas pode reduzir significativamente a produtividade da cultura. A utilização de híbridos suscetíveis a MBM torna necessária o uso de produtos químicos no controle da doença. Diversos agentes bióticos e abióticos são considerados indutores de defesas. A associação de indutores de defesa ao controle químico pode auxiliar na redução da MBM. O objetivo do trabalho foi avaliar se o silício e *Azospirillum brasilense* reduzem a severidade da MBM, associados ou não a dois fungicidas (picoxistrobina + ciproconazole e mancozebe) e um antibiótico (casugamicina). O experimento a campo totalizou 15 tratamentos, com as combinações de silício, *A. brasilense* e produtos químicos, além da testemunha. Foram avaliadas a severidade da MBM e produtividade da cultura, utilizando o híbrido P1680YH. O fungicida mancozebe resultou na menor taxa de progresso da severidade e área abaixo da curva de progresso da doença da MBM, resultando na maior produtividade da cultura. O silício e *Azospirillum brasilense* reduziu a severidade da MBM, auxiliando no controle químico e aumentando a produtividade. Quando associado aos produtos químicos o *Azospirillum brasilense* reduziu a eficácia dos produtos químicos aumentando a severidade da MBM. O experimento em laboratório avaliou a eficácia dos ingredientes ativos dos produtos químicos testados, sob a bactéria *Pantoea ananatis*, em placas de petri. A bactéria apresentou uma elevada sensibilidade ao fungicida mancozebe, uma baixa sensibilidade aos antibiótico casugamicina e foi insensível aos ingredientes ativos ciproconazol e picoxistrobina, isolados ou associados.

Palavras-chave: Doença. Mancha branca. Severidade. Zea Mays.

CAPÍTULO II

CHEMICAL CONTROL OF *Pantoea ananatis* ASSOCIATED WITH SILICON AND *Azospirillum brasilense*

ABSTRACT

The maize white spot (MWS) (*Pantoea ananatis*) is the main corn disease and under severe conditions can significantly reduce crop yield. The use of hybrids susceptible to MBM makes it necessary to use chemicals to control the disease. Several biotic and abiotic agents are considered defensive inducers. The association of defence inducers to chemical control may help to reduce MWS. The objective of this work was to evaluate if silicon and *Azospirillum brasilense* reduce the severity of MWS, associated or not with two fungicides (picoxystrobin + ciproconazole and mancozeb) and one antibiotic (casugamycin). The field experiment totalled 15 treatments, with the combinations of silicon, *A. brasilense* and chemical products, besides the control. The severity of MWS and crop productivity were evaluated using the hybrid P1680YH. The mancozeb fungicide resulted in the lower rate of progression of the severity and area below of disease progress curve the MWS, resulting in higher crop productivity. Silicon and *Azospirillum brasilense* reduced the severity of MWS, aiding in chemical control and increasing productivity. When associated with chemicals, *Azospirillum brasilense* reduced the effectiveness of chemicals by increasing the severity of MBM. The laboratory experiment evaluated the efficacy of the active ingredients of the tested chemicals under the bacterium *Pantoea ananatis* in petri dishes. The bacterium presented a high sensitivity to the fungicide mancozeb, a low sensitivity to the antibiotic casugamycin and was insensitive to the active ingredients cyproconazole and picoxystrobin, isolated or associated.

Key-words: Disease. White spot. Severity. Zea Mays.

8 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é uma das principais culturas no cenário agrícola brasileiro, segundo CONAB (2018a) é estimada uma produção de 92.000 mil toneladas de grãos durante safra e safrinha de 2017/2018. Porém, atualmente 70 % da produção passou a ser realizada no período de segunda safra, após o cultivo da cultura da soja.

A migração no período de cultivo do milho, associado ao manejo da atual da cultura, como utilização de híbridos suscetíveis, com elevadas densidades populacionais de plantas em sistema de plantio direto, porém, com sucessão anual de cultivo, além do uso de sistemas de irrigação, propiciam a manutenção do inóculo e condições climáticas e microclimáticas favoráveis ao desenvolvimento das doenças na cultura (CONAB, 2018b; PINTO; SANTOS; WRUCK, 2006).

A mancha branca do milho (MBM) é a principal doença na cultura do milho e adquiriu caráter endêmico em diversas regiões produtoras do país, podendo reduzir em até 60% a produtividade de grãos (BRITO et al., 2013). O agente etiológico da MBM foi inicialmente descrito como o fungo *Phaeosphaeria maydis* por Rane; Payak; Renfro (1966).

Entretanto, estudos atuais têm questionado a patogenicidade da *P. maydis* e atribuindo a bactéria *Pantoea ananatis* como agente causal da MBM. No entanto, diversas espécies fungicas oportunistas (*Phaeosphaeria maydis*, *Phyllosticta* sp., *Phoma* sp., *P. sorghina*, e *Sporormiella* sp.) podem colonizar lesões pré-estabelecida pela bactéria (LANZA et al., 2013; PACCOLA-MEIRELLES et al., 2001).

Os sintomas característicos da MBM apresentam-se inicialmente por lesões anasarcas circulares pequenas de coloração verde pálida, no decorrer do tempo, as lesões se ampliam, chegando a medir de 0,3 a 1,0 cm de diâmetro, tornando-se lesões circulares ou elípticas de coloração esbranquiçada, necróticas e secas (OLIVEIRA et al., 2004). Os sintomas da MBM provocam a redução da área fotossintetizante ativa da cultura do milho, reduzindo a fotossíntese líquida e conseqüentemente a produtividade de grãos (GODOY; AMORIM; FILHO, 2001).

A utilização de produtos químicos em híbridos suscetíveis a MBM é indispensável para manutenção da produtividade da cultura. Dentre os produtos recomendados para o controle da *Pantoea ananatis*, o fungicida protetor mancozebe tem apresentado uma elevada eficácia no controle da MBM (MANERBA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012).

Por se tratar de uma bactéria, Manerba et al. (2013), avaliou o antibiótico oxitetraciclina + estreptomicina, que apresentou um controle significativo da MBM, porém inferior ao

tratamento com o fungicida mancozebe. O fungicida sistêmico azoxistrobina + ciproconazol resultou na maior produtividade da cultura, porém, não teve a maior eficácia de controle da MBM (JULIATTI et al., 2014),

A associação de produtos químicos com indutores de defesa pode ser uma alternativa para aumentar a eficácia de controle das doenças, aumentando a proteção de plantas e segurança alimentar (GOZOO; FAORO, 2013). A exposição de agente bióticos (microrganismos não patogênicos, como inoculantes) e abióticos (proteínas; polissacarídeos, fitohormônios, aminoácidos e nutrientes, como fósforo, potássio e silício), pode induzir a produção das defesas de plantas, promovendo a resistência das plantas à diversos agentes patogênicos (REGLINSKI; DANN; DEVERALL, 2014).

Diversos estudos relatam que o silício e *Azospirillum brasilense* apresentam potencial de indução de defesas em diversas culturas (POZZA; POZZA; BOTELHO, 2015; ROMERO et al., 2003). Entretanto não há relatos na literatura do uso de silício e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho referentes a redução da severidade da MBM.

O silício é um mineral, não essencial para as culturas, porém, muito utilizado e estudado como indutor de defesas em plantas. As respostas de defesa de plantas mediadas pelo silício são uma combinação de mecanismos físicos, bioquímicos e moleculares (RODRIGUES, et al. 2003; SILVA, et al. 2012; WANG et al, 2017).

A bactéria *Azospirillum brasilense*, atualmente utilizada como inoculante em milho, proporciona fixação de nitrogênio e produção de hormônios de crescimento (AMBROSINI; SOUZA; PASSAGLIA, 2016). Entretanto, estudos recentes relataram que a inoculação de *A. brasilense* em plantas de milho resultou na regulação de genes relacionados ao estresse oxidativo e genes relacionados a patogênese, como *PR1* e *prp4*, aumentando a resistência das plantas de milho ao estresse biótico e abiótico (FUKAMI et al. 2017).

O objetivo do trabalho foi avaliar a eficácia de produtos químicos associados ao uso de substâncias possíveis de induzir defesas, o silício e *Azospirillum brasilense*, no controle da *Pantoea ananatis* em um híbrido de milho suscetível a MBM.

9 MATERIAL E MÉTODOS

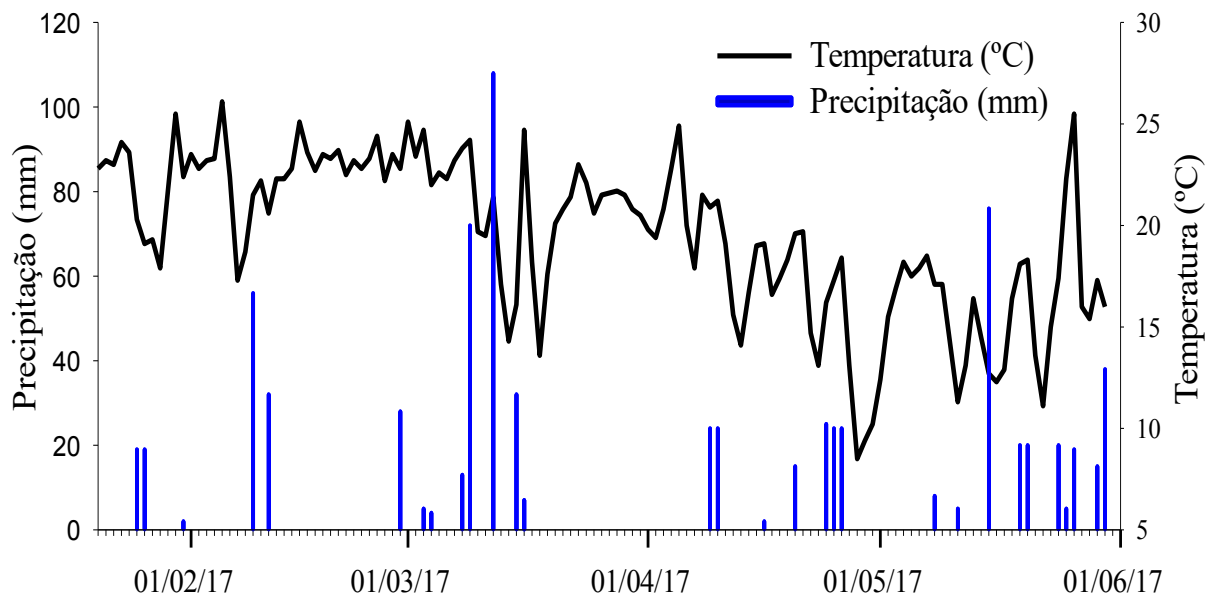
9.1 EXPERIMENTO DE CAMPO

9.1.1 Local e época de semeadura do experimento

O experimento foi conduzido em sistema de semeadura direta, no dia 20 de janeiro de 2017, na Área Experimental do Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), em Santa Maria, Rio Grande do Sul. Localizada nas coordenadas 29° 43' Sul e 53° 44' Oeste, com altitude média de 116 m.

O clima da região é classificado como Cfa (subtropical úmido) conforme Köppen, precipitação média anual de 1.712,4 mm e temperatura média anual de 19,1°C, sendo a média máxima do mês mais quente de 30,7°C e a mínima do mês mais frio de 9,8°C (HELDWEIN; BURIOL; STRECK, 2009). Os dados climáticos referente a precipitação (mm) e temperatura média diária, durante o desenvolvimento do experimento a campo, estão representados na Figura 1.

Figura 1 – Condições climáticas de precipitação (mm) e temperatura média (°C) durante o experimento de campo. Santa Maria – RS.



9.1.2 Manejo e híbrido

O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. As unidades experimentais foram formadas por cinco fileiras com quatro metros de comprimento, espaçamento entre fileiras de 0,45 m e espaçamento entre plantas de 0,278 m, totalizando uma população de 80.000 plantas por hectare. A área útil considerada foi de 4,05 metros, utilizando as três fileiras centrais em três metros no centro da parcela, para avaliações e colheita do experimento.

O híbrido utilizado foi o P1680YH da DuPont Pioneer[®], suscetível a MBM. A adubação de base foi de 150 kg ha⁻¹ de um formulado NPK (10-30-20) e a adubação de cobertura foi de 200 kg ha⁻¹ de ureia. Durante o desenvolvimento da cultura fez-se o manejo fitossanitário, através de aplicações de inseticida e roçagem das plantas daninhas.

9.1.3 Tratamentos

Os tratamentos foram formados através da combinação de *Azospirillum brasilense*, aplicado via tratamento de sementes (100 g para 25 kg de semente), utilizando o produto de marca comercial AzoTotal[®] com 2x10⁸ UFC g⁻¹, das estirpes abv5 e abv6 de *A. brasilense* e silicato de potássio (2,0 l ha⁻¹), marca comercial Supa silica[®], com concentração de 20% de silício, associado ou não a três produtos químicos comerciais.

O fungicida protetor Unizeb gold[®] (mancozebe), fungicida sistêmico Aproach prima[®] (picoxistrobina e ciproconazol) e o antibiótico Kasumin[®] (casugamicina). As combinações das substâncias possíveis de induzir as defesas, silício e *Azospirillum brasilense*, com os produtos químicos testados, formando os tratamentos, estão descritos na tabela 1.

As aplicações dos tratamentos, menos do *Azospirillum brasilense*, foram realizadas em duas etapas, nos estádios vegetativos de V8 (plantas com 8 folhas completamente expandidas) e pré-pendoamento. As aplicações foram realizadas utilizando um pulverizador costal pressurizado a CO₂, com pressão constante de 40 libras pol⁻² dotado de quatro pontas de pulverização tipo leque 110.015, espaçadas em 0,50 m, totalizando uma faixa de aplicação de 2,0 m e volume de calda de 150 L ha⁻¹.

Tabela 1. Descrição dos tratamentos utilizados no experimento a campo, com ingredientes ativos (i.a.) e doses dos produtos químicos e indutores de defesas testados. Santa Maria – RS.

| Tratamentos | Dose (i.a.) |
|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| Testemunha | - |
| <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) – TS ¹ | 100g / 25 kg de sementes |
| Silício | 0,4 L ha ⁻¹ |
| Mancozebe | 1,125 kg ha ⁻¹ |
| Mancozebe + AZO | 1,125 kg ha ⁻¹ + 100g / 25 kg de sem. |
| Mancozebe + Silício | 1,125 kg ha ⁻¹ + 0,4 L ha ⁻¹ |
| Mancozebe + AZO (TS) + Silício | 1,125 kg ha ⁻¹ + 100g / 25 kg de sem. + 0,4 L ha ⁻¹ |
| Picoxistrobina e Ciproconazol | 80 g ha ⁻¹ e 32 g ha ⁻¹ |
| Picoxistrobina e Ciproconazol + AZO (TS) | 80 g ha ⁻¹ e 32 g ha ⁻¹ + 100g / 25 kg de sem. |
| Picoxistrobina e Ciproconazol + Silício | 80 g ha ⁻¹ e 32 g ha ⁻¹ + 0,4 L ha ⁻¹ |
| Picoxistrobina e Ciproconazol + AZO (TS) + Silício | 80 g ha ⁻¹ e 32 g ha ⁻¹ + 100g / 25 kg de sem. + 0,4 L ha ⁻¹ |
| Casugamicina | 30 g ha ⁻¹ |
| Casugamicina +AZO (TS) | 30 g ha ⁻¹ + 100g / 25 kg de sem. |
| Casugamicina + Silício | 30 g ha ⁻¹ + 0,4 L ha ⁻¹ |
| Casugamicina + AZO (TS) + Silício | 30 g ha ⁻¹ + 100g / 25 kg de sem. + 0,4 L ha ⁻¹ |

¹ Tratamento de sementes.

9.1.4 Avaliação e análise estatística

A severidade da MBM, de infecção natural, foi avaliada semanalmente a partir da primeira aplicação dos tratamentos, em V8, através da quantificação da área foliar lesionada na folha da espiga, em 10 plantas aleatórias da área útil de cada unidade experimental, utilizando a escala diagramática proposta por Sachs et al. (2011). De posse dos dados referentes à severidade da MBM foi calculada a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD), utilizando a metodologia proposta por Shaner e Finney (1977).

A produtividade foi avaliada pela colheita das espigas da área útil, que posteriormente, foram trilhadas em trilhadora estacionária e os grãos foram pesados e sua umidade foi quantificada. Os dados foram extrapolados para Mg ha⁻¹, com a umidade corrigida para 13,0%.

Os dados foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade pelo teste F e as médias foram comparadas pelo teste de Scott-Knott, além da separação de grupos para avaliação por contrastes ortogonais, com auxílio do programa estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

9.2 EXPERIMENTO DE SENSIBILIDADE IN VITRO

9.2.1 Local e época do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) no último semestre do ano de 2017.

9.2.2 Obtenção do isolado

O isolado de *P. ananatis* foi obtido a partir da coleta de folhas de milho que apresentavam os sintomas iniciais da doença, em uma lavoura comercial no município de Jóia – RS. Posteriormente, o material coletado foi encaminhado ao Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As lesões iniciais da MBM foram destacadas das folhas, para posterior desinfecção e cultivo em meio de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), onde foram mantidas em câmara de crescimento (BOD), a 30° C por 48 horas. Após crescimento das colônias o patógeno foi identificado e repicado.

9.2.3 Produtos químicos

Os produtos químicos utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 2 - Produtos químicos com marca comercial, ingrediente ativo e suas concentrações utilizados no experimento de sensibilidade *in vitro* sob a *Pantoea ananatis*. Santa Maria – RS.

| Marca Comercial | Ingrediente Ativo | Concentração |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------------------|
| Aproach Prima® | Picoxistrobina + Ciproconazol | 200 g L ⁻¹ + 80 g L ⁻¹ |
| Oranis® | Picoxistrobina | 250 g L ⁻¹ |
| Alto 100® | Ciproconazol | 100 g L ⁻¹ |
| Kasumin® | Casugamicina | 20 g L ⁻¹ |
| Unizeb Gold® | Mancozebe | 750 g kg ⁻¹ |

9.2.4 Concentrações avaliadas

Os produtos comerciais foram diluídos, utilizando água estéril, para formar as soluções bases. Em seguida para formar as soluções experimentais foi adicionado 1 ml de cada solução

base, utilizando uma micropipeta digital, em 79 ml de meio de cultura de batata-dextrose-ágar (BDA), fundida e mantida a 50° C utilizando um banho maria digital, totalizando 80 ml de meio de cultura com as concentrações avaliadas de cada produto. Em seguida os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri, estéreis, formando quatro repetições por concentração. As concentrações avaliadas de cada produto químico estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 – Concentrações dos meios de cultura em parte por milhão (PPM) dos ingredientes ativos, formados para avaliar a sensibilidade *in vitro* da *Pantoea ananatis*.

| Ingrediente Ativo | Concentração em PPM¹ |
|---------------------------------------|------------------------------------------|
| Picoxistrobina + Ciproconazole | 0 - 1700 - 2100 - 2500 - 2900 |
| Picoxistrobina | 0 - 900 - 1300 - 1700 - 2100 |
| Ciproconazole | 0 - 1700 - 2100 - 2500 - 2900 |
| Casugamicina | 0 - 100 - 500 - 900 - 1300 - 1700 - 2100 |
| Mancozebe | 0 - 0,1 - 1 - 5 - 10 |

¹PPM – Parte por milhão

9.2.5 Inoculação de *Pantoea ananatis*

Após a formação dos meios de cultura, em placas de Petri, contendo as diferentes concentrações dos produtos testados, foi realizada a inoculação de 1 ml, com auxílio de uma micropipeta digital, da solução contendo colônias de *Pantoea ananatis*. A solução foi formada pela raspagem de 10 placas de Petri colonizadas pela bactéria, com auxílio de uma alça de Drigalski e solução salina (0,9 % NaCl), em seguida as colônias foram filtradas por gases estéreis e diluídas em solução salina (0,9 % NaCl).

9.2.6 Delineamento e análise estatística

Cada unidade experimental foi constituída por uma placa de Petri em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os dados obtidos pela contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) foram utilizados para a análise da regressão e cálculo da DL50 (dosagem necessária para inibir 50% das colônias de *Pantoea ananatis*) para cada produto, com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011). Em seguida os produtos foram classificados em quatro categorias, segundo sua DL50, de acordo com a escala adaptada de Edgington et al. (1971), onde: insensíveis se a DL50 >50 PPM; moderadamente sensíveis se a DL50 estiver entre 1e 10 PPM; altamente sensíveis se a DL50 < 1 PPM.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

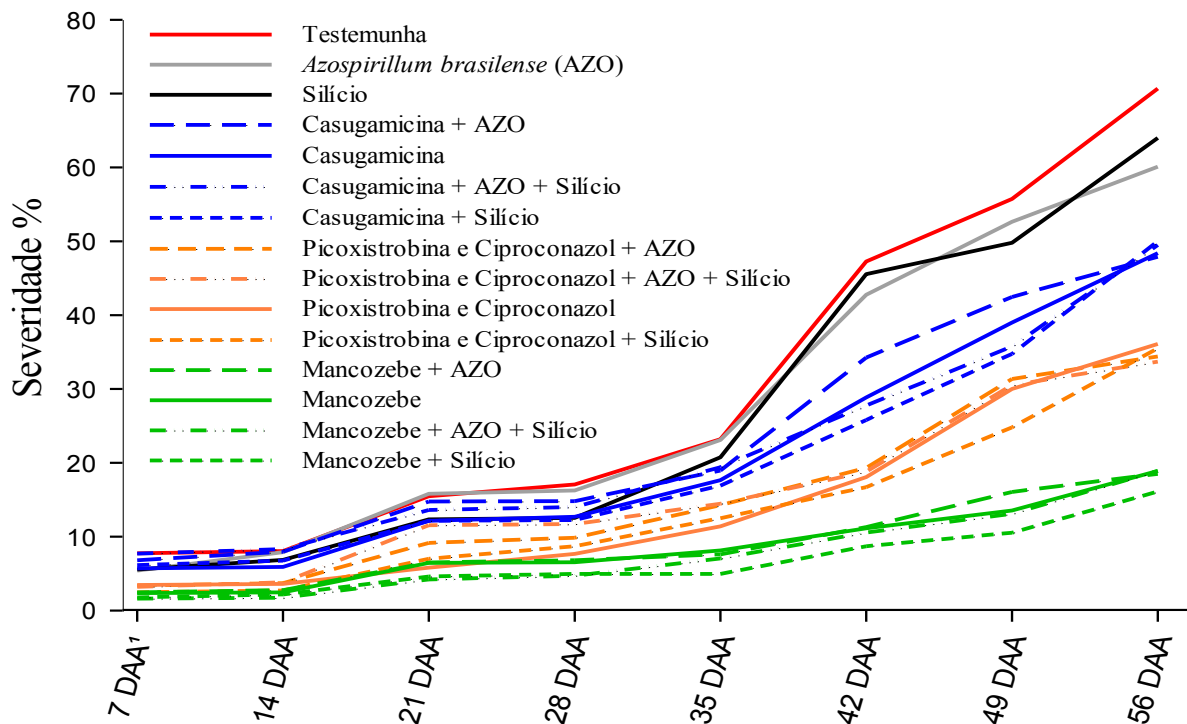
10.1 EXPERIMENTO DE CAMPO

10.1.1 Severidade e curva de progresso da MBM

Na figura 2 é possível observar o comportamento dos progressos das severidades da MBM dos diferentes tratamentos, a partir da primeira semana após a aplicação dos tratamentos via foliar, realizada no estágio vegetativo de V8. Os diferentes produtos testados e suas combinações com silício e *Azospirillum brasilense*, formaram quatro grupos, com curvas de progresso da severidade semelhantes.

Os tratamentos com o fungicida mancozebe e suas combinações com silício e *Azospirillum brasilense* resultaram nas menores taxas de progresso da MBM, reduzindo aproximadamente 50% da severidade da MBM aos 56 DAA avaliação observada, em comparação com a testemunha.

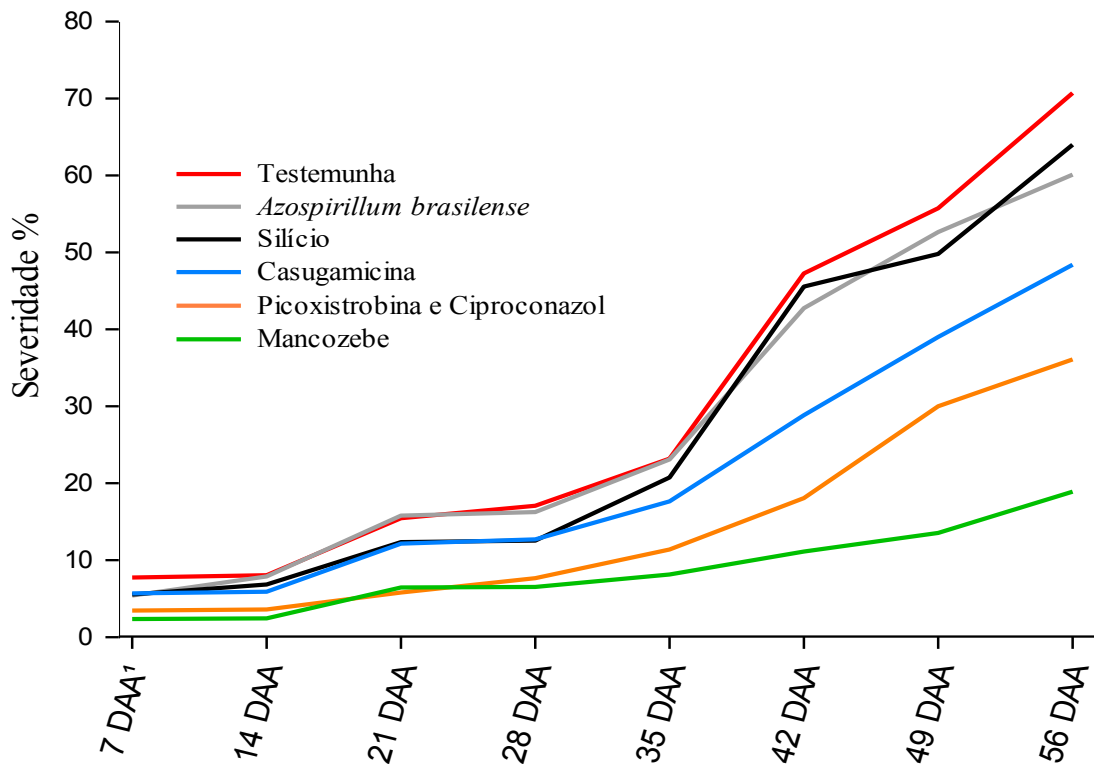
Figura 2 - Curvas de progresso da severidade de *Pantoea ananatis* no milho dos tratamentos testados. Santa Maria – RS.



¹ Dias Após a Aplicação em V8

As curvas de progresso da severidade da MBM dos tratamentos isolados estão representadas na figura 3. O mancozebe apresentou a menor taxa de progresso da MBM, seguido pelo tratamento com picoxistrobina + ciproconazol e casugamicina. O silício reduziu a taxa de progresso da MBM em relação a testemunha de forma semelhante ao antibiótico casugamicina até os 28 dias após a primeira aplicação (DAA), enquanto o *Azospirillum brasilense*, aplicado em tratamento de semente, apresentou uma taxa de progresso da MBM semelhante a testemunha até os 35 DAA.

Figura 3 - Curvas de progresso da severidade de *Pantoea ananatis* no milho dos tratamentos sem as combinações com *Azospirillum brasilense* e Silício. Santa Maria – RS.



¹ Dias Após a Aplicação em V8

10.1.2 Produtividade e AACPD da MBM

As variáveis da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) e produtividade dos tratamentos estão demonstradas na tabela 3. A testemunha sem aplicação resultou na maior AACPD de 1142,10 e a menor produtividade de 4,73 Mg ha⁻¹, aproximadamente, 32% menor

em comparação ao tratamento formado pela combinação do mancozebe, silício e *A. brasilense*, que resultou na maior produtividade da cultura, 6,95 Mg ha⁻¹.

Tabela 3 - Área abaixo da curva de progresso e produtividade de grãos de milho. Santa Maria – RS.

| Tratamentos | AACPD ¹ | Produtividade Mg ha ⁻¹ |
|------------------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Testemunha | 1442,1 a ² | 4,73 g ² |
| <i>Azospirillum brasilense</i> (AZO) | 1338,4 b | 5,38 e |
| Silício | 1278,4 b | 5,15 f |
| Mancozebe | 412,0 g | 6,09 c |
| Mancozebe + AZO | 430,3 g | 6,74 b |
| Mancozebe + Silício | 313,9 h | 6,52 b |
| Mancozebe + AZO + Silício | 361,0 h | 6,95 a |
| Picoxistrobina e Ciproconazol | 674,2 f | 5,68 d |
| Picoxistrobina e Ciproconazol + AZO | 745,3 e | 5,90 c |
| Picoxistrobina e Ciproconazol + Silício | 639,6 f | 5,81 d |
| Picoxistrobina e Ciproconazol + AZO + Silício | 764,8 e | 6,10 c |
| Casugamicina | 1003,1 d | 5,08 f |
| Casugamicina +AZO | 1123,5 c | 5,42 e |
| Casugamicina + Silício | 956,7 d | 5,14 f |
| Casugamicina + AZO + Silício | 1031,8 d | 5,59 d |
| CV³ | 6,15 | 3,04 |

¹ Área abaixo da curva de progresso da doença. ² médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott a nível de 5% de probabilidade. ³ CV: coeficiente de variação.

Em estudos de eficácia de produtos químico no controle da MBM, o fungicida protetor mancozebe tem demonstrado uma elevada eficácia no controle da doença, podendo resultar em uma produtividade 100% maior, em comparação com a testemunha sem aplicação (MANERBA et al., 2013). Entretanto, o controle da MBM com mancozebe só é significativo em híbridos de milho suscetíveis a doença (PEREIRA et al., 2012).

Estudos demonstram que espécies bacterianas são sensíveis ao ingrediente ativo mancozebe, apesar de ser classificado como fungicida, como as bactérias *Xanthomonas perforans* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (COLIN; McCARTER, 1983; NASCIMENTO et al., 2013). Entretanto, o mancozebe resulta no controle do agente causal da MBM, a bactéria *Pantoea ananatis*, e também pode ser eficaz sobre os fungos oportunistas, como, *P. maydis*, *Phyllosticta* sp., *Phoma* sp., *P. sorghina*, e *Sporormiella* sp., que podem colonizar as lesões pré-estabelecidas pela bactéria (BOMFETI et al., 2008).

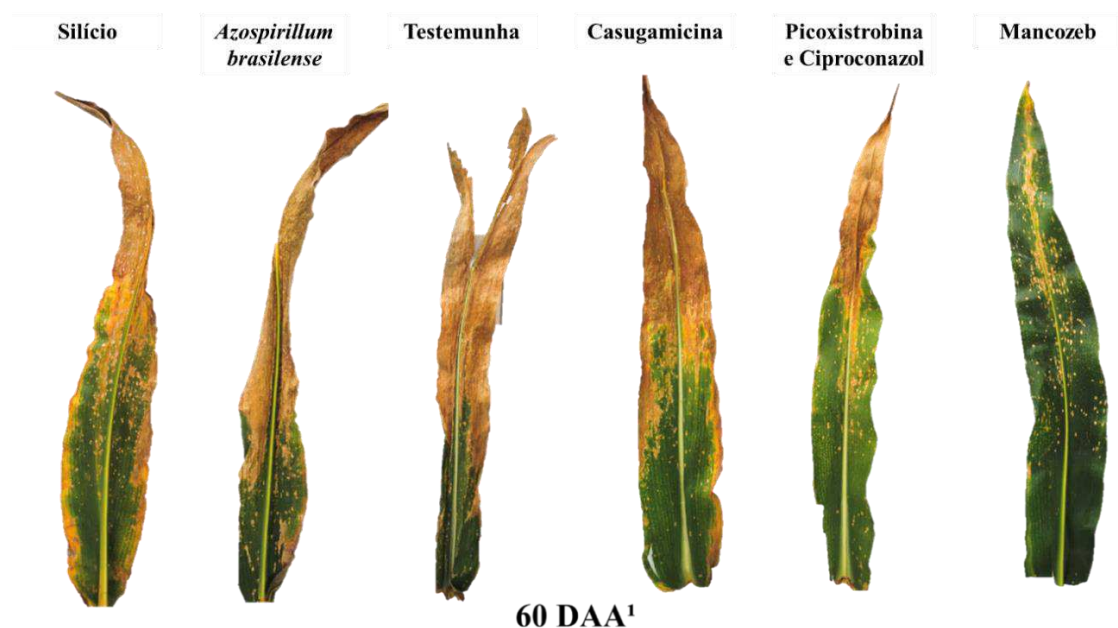
Esta lógica pode explicar a baixa eficácia de controle da MBM pelo antibiótico casugamicina, a campo, quando comparado com o fungicida mancozebe. Pois, as lesões da *P. ananatis* não controladas pelo antibiótico, podem ser colonizadas pelos fungos oportunistas, aumentando as lesões da doença e dificultando a avaliação da severidade da MBM em relação à eficácia do antibiótico sobre a *Pantoea ananatis*.

Sendo que, diversos estudos têm mostrado que antibióticos, como, casugamicina, oxitetraciclina e oxitetraciclina + estreptomicina, reduzem a severidade da doença a campo, mas apresentam uma baixa eficácia de controle da MBM (COSTA et al., 2012; JULIATTI et al., 2014; MANERBA et al., 2013).

Se a aplicação de silício na cultura do milho, não aumenta o rendimento de grãos (FREITAS et al., 2011). A aplicação de silício, via foliar, isolado ou associado aos produtos químicos, aumentou a resistência do híbrido de milho, suscetível, a MBM. Pois, a aplicação de silício reduziu a AACPD da MBM, aumentando o rendimento de grãos da cultura.

A figura 4 ilustra a diferença visual da eficácia de controle da MBM entre os produtos químicos testados, no híbrido P1680YH. Nos piores tratamentos, é possível observar a elevada severidade da MBM, onde as lesões coalesceram e as folhas estão em processo de senescência.

Figura 4 – Ilustração da diferença da severidade da mancha branca do milho entre os tratamentos, pelas folhas da espiga coletadas aos 60 dias após a primeira aplicação via foliar. Santa Maria – RS.



¹ Dias Após a Aplicação em V8.

Para verificar o efeito do silício e *Azospirillum brasilense*, isolados ou em combinação com os produtos químicos, sobre as variáveis de AACPD e produtividade, foram formados grupos de tratamentos para análise de comparação por contrastes ortogonais, através do teste F (Tabela 4.)

Tabela 4 - Contrastes ortogonais entre os grupos de tratamentos e suas estimativas para AACPD e produtividade. Santa Maria – RS.

| | Contrastes | Estimativas ¹ | |
|----|------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | | AACPD ² | Produtividade ³ |
| 1 | Testemunha x Tratamentos | 9115,67 | -242,36 |
| 2 | Testemunha x Indutores de defesa (ID) | 267,33 | -17,81 |
| 3 | Prod. x Prod. + AZO | -209,90 | -30,50 |
| 4 | Prod. X Prod. + Silício | 178,98 | -10,41 |
| 5 | Prod. x Prod. + AZO + Silício | -68,33 | -29,70 |
| 6 | Prod. + AZO x Prod. + Silício | 388,88 | 20,10 |
| 7 | Prod. + ID isolados x Prod. + ID associados | -105,73 | -28,79 |
| 8 | Picox e Cipro x Picox e Cipro + AZO | -71,18 | -3,73 |
| 9 | Picox e Cipro x Picox e Cipro + Silício | 34,53 | -2,18 |
| 10 | Picox e Cipro x Picox e Cipro + AZO + Silício | -90,60 | -6,89 |
| 11 | Picox e Cipro + AZO x Picox e Cipro + Silício | 105,70 | 1,55 |
| 12 | Picox e Cipro + ID isolados x Picox e Cipro + ID associado | -144,55 | -7,87 |
| 13 | Mancozebe x Mancozebe + AZO | -18,33^{ns} | -10,76 |
| 14 | Mancozebe x Mancozebe + Silício | 98,08 | -7,22 |
| 15 | Mancozebe x Mancozebe + AZO + Silício | 50,98 | -14,33 |
| 16 | Mancozebe + AZO x Mancozebe + Silício | 116,40 | 3,55 |
| 17 | Mancozebe + ID isolados x Mancozebe + ID associado | 22,20^{ns} | -10,68 |
| 18 | Casugam x Casugam + AZO | -120,40 | -5,71 |
| 19 | Casugam x Casugam + Silício | 46,38 | -1,01^{ns} |
| 20 | Casugam x Casugam + AZO + Silício | -28,70 | -8,48 |
| 21 | Casugam + AZO x Casugam + Silício | 166,78 | 4,70 |
| 22 | Casugam + ID isolados x Casugam + ID associado | 16,63^{ns} | -10,24 |

¹ Estimativas dos grupos contrastados (positivo quando o primeiro grupo é superior ao segundo e negativo quando o primeiro grupo é inferior ao segundo). ² Área abaixo da curva de progresso da doença. ³ Produtividade sc ha⁻¹
^{ns} Diferença não significativa ao teste F.

Abreviações: Casugam= Casugamicina; Picox e Cipro =Picoxistrobina e Ciproconazol; Prod. = Produtos (Mancozebe + Casugam + Picox e Cipro); e ID = Indutores de defesa (AZO + Silício).

A aplicação isolada de silício e *Azospirillum brasilense* reduz a AACPD e aumenta a produtividade da cultura, em relação a testemunha (Contraste 2 – Tabela 4). Entretanto, no contraste 3, observa-se que, a aplicação de *Azospirillum brasilense*, em TS, quando foi associado aos produtos químicos, resultou em um maior desenvolvimento da doença (AACPD),

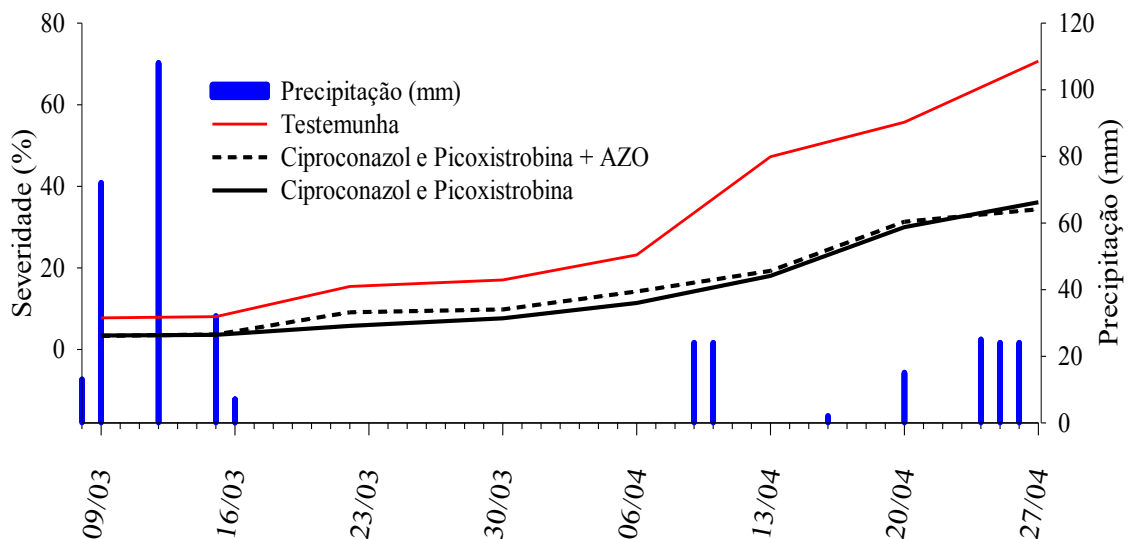
comparados a aplicação dos produtos químicos isolados, contradizendo o efeito positivo da aplicação isolada do *Azospirillum brasilense* na redução da AACPD da MBM.

Esse efeito contraditório, pode ser explicado devido ao período de estiagem, de 25 dias, durante desenvolvimento do experimento, que iniciou logo após a última aplicação dos produtos químicos, no estágio vegetativo de V12 (17/03). Este período de estiagem prolongado, provavelmente, deixou as plantas de milho em uma condição de estresse hídrico (Figura 5).

Em déficit hídrico a degradação dos ativos químicos dos produtos nas plantas é reduzida, em função da menor atividade fisiológica, da queda na condutância estomática e do fechamento dos estômatos das culturas (OHASHIET al., 2006; LEI et al., 2006).

Porém, as plantas inoculadas com *Azospirillum brasilense* possivelmente estavam com um menor estresse hídrico. Uma vez que, a aplicação de *Azospirillum brasilense* proporciona um maior volume de raízes, que incrementa o conteúdo de água das folhas, podendo mitigar o estresse hídrico de plantas de milho, que tiveram uma redução de até 75% no suprimento de água (CASANOVAS et al., 2002).

Figura 5 – Comportamento das curvas de progresso da mancha branca do milho do controle químico ciproconazol + picoxistrobina, associado ou não *Azospirillum brasilense*, via tratamento de sementes, da testemunha e precipitação diária (mm) durante o experimento a campo. Santa Maria – RS.



Na figura 5, assim como a AACPD, é possível observar que o progresso da severidade da MBM foi maior quando o tratamento com ciproconazol + picoxistrobina foi associado ao *Azospirillum brasilense* (TS), durante o período de estiagem.

Ou seja, os tratamentos com os produtos químicos associados ao *Azospirillum brasilense*, provavelmente estavam em uma condição de menor estresse hídrico e consequentemente tiveram os ingredientes ativos dos fungicidas degradados mais rapidamente pela planta, aumentando a severidade e AACPD da MBM. Enquanto, os tratamentos com os produtos químicos não associados ao *Azospirillum brasilense*, estavam provavelmente com um maior estresse hídrico e consequentemente uma menor degradação dos ingredientes ativos, prolongando o residual do produto e reduzindo a severidade e AACPD da MBM.

A associação do *Azospirillum brasilense* aos produtos químicos proporcionou um aumento significativo na produtividade da cultura, superior aos tratamentos com os mesmos produtos químicos aplicados isolados, mesmo reduzindo o residual dos produtos químicos. Fato que pode estar relacionado com os benefícios diretos da aplicação do *Azospirillum brasilense* em TS na produtividade de cultura.

Pois, a utilização de *Azospirillum brasilense* na cultura do milho altera o metabolismo e a morfologia das raízes das plantas, melhorando a absorção de água e nutrientes, além da disponibilização de nitrogênio atmosférico (DOBBELAERE; VANDERLEYDEN; OKON, 2003; SAIKIA et al., 2012), resultando em produtividades de 6 a 27% maiores com a utilização de *Azospirillum brasilense* (BARTCHECHEN et al. 2010; BRACCINI et al., 2012; HUNGRIA et al., 2010; KAPPES et al., 2013; LANA et al., 2012; MAZZUCHELLI et al., 2014).

No contraste 4 (tabela 4), é possível observar que o silício associado ou não aos produtos químicos proporcionou um maior controle MBM, resultando em uma menor AACPD e consequentemente uma maior produtividade da cultura, principalmente quando combinado com o fungicida mancozebe. A combinação tripla com os produtos químicos e os dois indutores de defesa, reduziram a AACPD e aumentaram a produtividade da cultura quando contrastados com as suas combinações simples ou isoladas (Contraste 5 – Tabela 4).

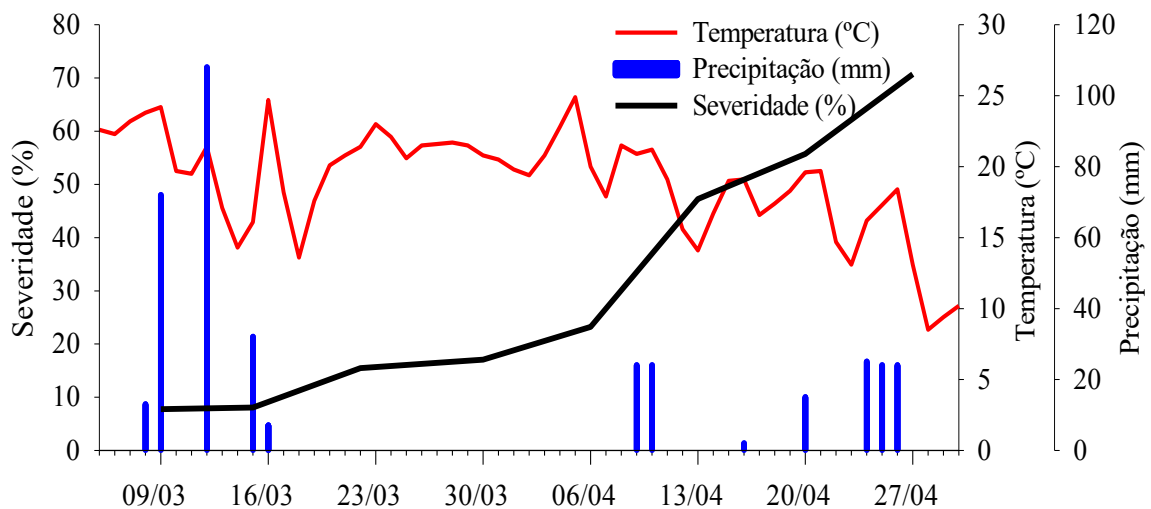
A associação dos produtos químicos com o silício proporcionou a menor AACPD, enquanto que, a associação dos produtos químicos com o *Azospirillum brasilense* proporcionou a maior produtividade da cultura (Contraste 6 – Tabela 4). A combinação tripla, dos produtos químicos, silício e *Azospirillum brasilense* resultou em uma menor AACPD e maior

produtividade da cultura quando contrastados com as combinações simples, observado no contraste 7.

10.1.3 Correlação entre curva de progresso da severidade da MBM e condições climáticas.

A figura 6 representa a importância das condições climáticas no desenvolvimento da MBM, pois segundo Juliatti et al. (2014) umidade acima de 60% e temperaturas noturnas baixas (14 °C), são condições ideais para o desenvolvimento da MBM. A estiagem de 25 dias, entre 16 de março a 9 de abril de 2017, reduziu a taxa de progresso da severidade de MBM, da testemunha, aumentando exponencialmente em apenas uma semana, após o retorno da precipitação, quando a temperatura média diária ficou entre 14 e 20 °C.

Figura 6 – Comportamento da curva de progresso da mancha branca do milho sem controle químico em resposta as condições climáticas de temperatura (°C) e precipitação (mm). Santa Maria – RS.



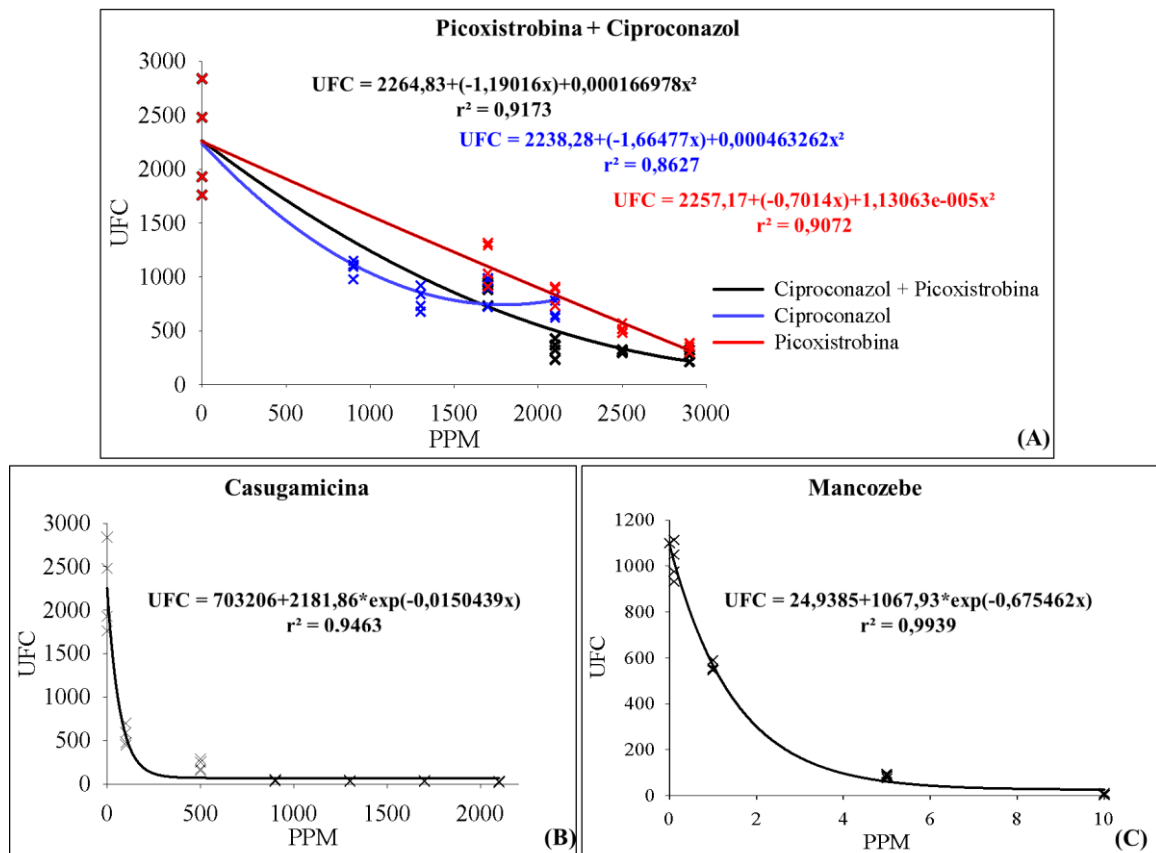
Por isso ter o conhecimento das condições climáticas, de precipitação, umidade relativa do ar e temperatura, nos períodos de cultivo de cada região produtora de milho, deve ser primordial para tomada de decisão da melhor época de plantio, visando diminuir as condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento da MBM.

10.2 EXPERIMENTO DE SENSIBILIDADE IN VITRO

As curvas de regressão da sensibilidade da bactéria *Pantoea ananatis* e as concentrações dos produtos químicos testados, assim como suas respectivas equações, estão representadas na figura 6. Nas regressões da figura 6.A é possível observar a sensibilidade da bactéria aos ingredientes ativos picoxistrobina e ciproconazol, associados ou isolados. Onde o ciproconazol apresentou o máximo de controle com 1.700 PPM do i.a., enquanto que 3.000 PPM de picoxistrobina reduz 80 % das UFC da *Pantoea ananatis*.

O picoxistrobina, fungicida pertencente ao grupo químico das estrobilurinas, resultou em uma maior eficácia no controle “in vitro” da bactéria em comparação ao ciproconazol, pertencente ao grupo químico dos triazóis. Bonon et al. (2006), demonstra que fungicidas do grupo químico das estrobilurinas apresenta potencial em suprimir o desenvolvimento de fitobactérias, enquanto, os triazóis não possuem esta característica.

Figura 6 – Sensibilidade de *Pantoea ananatis* as diferentes concentrações dos ingredientes ativos ciproconazol, picoxistrobina, casugamicina e mancozebe. Santa Maria – RS.



Para o antibiótico casugamicina e o fungicida protetor mancozebe a regressão exponencial foi a melhor ajustada para o comportamento das UFC da bactéria *P. ananatis* (figura 6.B e C). O antibiótico casugamicina, regressão 6.B, apresentou uma elevada eficácia no controle da bactéria nas maiores concentrações avaliadas. A bactéria *Pantoea ananatis* demonstrou uma alta sensibilidade no desenvolvimento de colônias ao fungicida protetor mancozebe, pois com apenas 10 PPM do produto o desenvolvimento da bactéria foi nulo (figura 6.C).

A tabela 5 demonstra as concentrações dos produtos necessários para controlar 50% das UFCs da *P. ananatis* (ED50). A bactéria *Pantoea ananatis* foi classificada com moderada sensibilidade ao fungicida mancozebe, baixa sensibilidade ao antibiótico casugamicina e insensível aos fungicidas sistêmicos picoxistrobina e ciproconazol.

Tabela 5 – Equações das regressões, ED50 e sensibilidade da *Pantoea ananatis* aos ingredientes ativos e as suas concentrações utilizadas na calda de pulverização do experimento de campo. Santa Maria – RS.

| Produtos | Equações da regressão | ED50 ¹ | Sens. ² | PPM ³ |
|-----------------------|----------------------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Picox + Cipro | $Y = 2264,83 + (-1,19016x) + 0,000166978x^2$ | 1138,82 | I | 666,67 + 266,67 |
| Ciproconazol | $Y = 2238,28 + (-1,66477x) + 0,000463262x^2$ | 887,12 | I | 666,67 |
| Picoxistrobina | $Y = 2257,17 + (-0,7014x) + 1,13063e-005x^2$ | 1656,98 | I | 266,67 |
| Casugamicina | $Y = 70,3206 + 2181,86 * \exp(-0,0150439x)$ | 48,24 | BS | 250,00 |
| Mancozebe | $Y = 24,9385 + 1067,93 * \exp(-0,675462x)$ | 1,05 | MS | 13333,33 |

¹ ED50, concentração (PPM) de ingredientes ativo capaz de inibir 50% do crescimento das colônias. ² Sensibilidade da *P. ananatis* aos produtos, MS (moderada sensibilidade), BS (baixa sensibilidade), I (insensível) ³ Concentração em PPM da calda de pulverização dos mesmos tratamentos a campo. Abreviações: Picox= Picoxistrobina; Cipro = Ciproconazol.

Ao comparar as concentrações em PPM da calda de pulverização dos produtos utilizados a campo, é possível fazer uma inferência do controle da MBM, pois os tratamentos que resultaram na menor AACPD e maior produtividade foram os que utilizaram o fungicida protetor mancozebe e sua concentração na calda de pulverização foi aproximadamente 13 mil vezes maior que sua ED50.

O antibiótico casugamicina apesar de ter uma concentração de calda cinco vezes maior que sua ED50, apresentou o menor controle da MBM e conseqüentemente a menor

produtividade da cultura, em relação aos demais tratamentos químicos testados no experimento a campo. Este fato pode estar relacionado com as lesões da MBM que não são controladas pelo antibiótico, uma vez que a bactéria apresenta uma baixa sensibilidade ao casugamicina. As lesões não controladas, podem ser colonizadas por fungos oportunistas como *P. maydis*, *Phyllosticta* sp., *Phoma* sp., *P. sorghina*, e *Sporormiella* sp. (BOMFETI et al., 2008), aumentando as lesões e dificultando a avaliação do produto sobre a severidade bactéria *P. ananatis*.

Apesar da bactéria *Pantoea ananatis* reduzir seu desenvolvimento *in vitro* com a presença dos fungicidas picoxistrobina e ciproconazol, associados ou isolado, é necessária uma elevada concentração dos ingredientes ativos, para um controle eficaz da bactéria, tornando o uso destes produtos inviável economicamente e ecologicamente.

11 CONCLUSÃO

O fungicida mancozebe apresentou a maior eficácia no controle “*in vivo*” e “*in vitro*” da bactéria *Pantoea ananatis*, resultando na menor severidade e AACPD, além da maior produtividade, principalmente quando associado ao silício e ao *Azospirillum brasilense*.

A aplicação de silício induziu as defesas do milho reduzindo a severidade da mancha branca do milho e conseqüentemente aumentando a produtividade da cultura. O *Azospirillum brasilense*, aplicado via tratamento de semente, resultou em um acréscimo na produtividade da cultura, compensado a maior severidade da mancha branca do milho, quando associado aos produtos químicos.

12 REFERÊNCIAS

- AMBROSINI, A.; SOUZA, R.; PASSAGLIA, L. M. P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant Soil**, v. 400, p. 193-207, 2016.
- BARTCHECHEN, A. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L). **Campo Digital**, v. 5, n. 1, p. 56-59, 2010.
- BOMFETI, C. A. et al. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 063-166, 2008.
- BONON, K. et al. Sensibilidade “in vitro” de fitobactérias a fungicidas do grupo das estrobilurinas. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 70, 2006.
- BRACCINI, A. L. et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bio-regulators in maize. **Rev. Caatinga**, v.25, n. 2, p. 58 - 64, 2012.
- BRITO, A. H. et al. Controle químico da Cercosporiose, Mancha-branca e dos Grãos Ardidados em milho. **Ceres**, v. 60, n. 5, p. 629-635, 2013.
- CASANOVAS, E. M., BARASSI, C. A., SUELDO, R. J. *Azospirillum* inoculation mitigates water stress effects in maize seedlings. **Cereal Research Communications**, n. 30, p. 343-350, 2002.
- COLIN, K. C.; Mc CARTER, S. M. Effectiveness of Selected Chemicals in Inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. tomato in vitro and in Controlling Bacterial Speck. **Plant Disease**, v. 67, n. 6., p. 640-644, 1983.
- CONABa. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, n. 4, v. 5., Jan. 2018.
- CONABb. Séries históricas de área plantada, produtividade e produção, relativas às safras 1976/77 a 2017/18 de grãos. 2018.
- COSTA, R. V. et al. Eficiência de fungicidas para o controle da mancha branca do milho. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.11, n.3, p. 291-301, 2012
- DOBBELAERE, S. VANDERLEYDEN, J.; OKON, Y. Plant Growth-Promoting Effects of Diazotrophs in the Rhizosphere Critical. **Reviews in Plant Sciences**, v. 22, n. 2, p. 107–149, 2003.
- EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds. **Phytopathology**, v. 61, p. 42-44, 1971.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

- FREITAS, L. B. et al. Adubação foliar com silício na cultura do milho. **Revista Ceres**, v. 58, n. 2, p. 262-267, 2011.
- FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, n. 7, p. 153, 2017.
- GODOY, C. V.; AMORIM, L.; FILHO, A. B. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 2, p. 209-215, 2001.
- GOZOO, F.; FAORO, F. Systemic Acquired Resistance (50 Years after Discovery): Moving from the Lab to the Field. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12473-12491, 2013.
- HELDWEN, A. B.; BURIOL, G. A.; STRECK, N. A. O clima de Santa maria. **Ciência & Ambiente**, n. 38, p. 43 – 58, 2009.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- JULIATTI, F. C. et al. Eficácia da associação de fungicidas e antibióticos no manejo da mancha branca do milho e seu efeito na produtividade. **Biosci. J.**, v. 30, n. 6, p. 1622-1630,
- KAPPES, C. et al. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciênc. Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527-538 2013.
- LANA, M. C. et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399 – 405, 2012.
- LANZA, F. E. et al. Etiology and epidemiological variables associated with maize resistance to white spot disease. **Journal of Plant Pathology**, Bari, v. 95, n. 2, p. 349-359, 2013.
- LEI, W.; TONG, Z.; SHENGYAN, D. Effect of drought and rewatering on photosynthetic physioecological characteristics of soybean. **Acta Ecologica S.**, v. 26, n. 7, p. 2073-2078, 2006.
- MANERBA, F. C. et al. Antibióticos no controle da Mancha Branca do Milho. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 4, p. 361-367, 2013.
- MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n. 2, p. 40-47, 2014.
- NASCIMENTO, A. R. et al. Controle químico da mancha-bacteriana do tomate para processamento industrial em campo. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n.1 p. 15- 24, 2013.
- OHASHI, Y. Effects of drought stress on photosynthetic gas exchange, chlorophyll fluorescence and stem diameter of soybean plants. **Biologica Plantarum**, v. 50, p.138-141, 2006.

- OLIVEIRA, E. et al. The phaeosphaeria leaf spot of maize in brazil: evidences of a new ethiologic agente. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 3, p. 343-356, 2004.
- PACCOLA-MEIRELLES, L. D. et al. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal Phytopathology**, v. 149, p. 275-279, 2001.
- PEREIRA, J. L. A. R. et al. Controle Químico da Mancha Branca na Cultura do Milho. **XXIX Congresso nacional de milho e sorgo**, 2012.
- PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 164-170, 2009.
- PINTO, N. F. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 82 – 94, 2006.
- POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; BOTELHO, M. S. Silicon in plant disease control. **Revista Ceres**, v. 62, n. 3, 2015.
- RANE, M. S., PAYAK, M. M., RENFRO, B. L. The Phaeosphaeria leaf spot of maize. **Indian Phytopathological Society**, v. 3, p. 7-10, 1966.
- REGLINSKI, T.; DANN, E.; DEVERALL B. **Implementation of Induced Resistance for Crop Protection Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection**, 2. ed., 2014.
- RODRIGUES, F. A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicone-mediated rice blast reistance. **Phytopathology**, v. 93, p. 535-546, 2003.
- ROMERO, A. M. et al. Effect of Azospirillum-mediated plant growth promotion on the development of bacterial diseases on fresh-market and cherry tomato. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 832-838, 2003.
- SACHS, P. J. D. et al. Escala diagramática para avaliação da severidade da mancha branca em milho. **Summa Phytopathology**, v. 37, n. 4, p. 202-204, 2011.
- SAIKIA, S. P. et al. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non-leguminous crops. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 6, n. 6, p. 1085-1102, 2012.
- SHANER, G.; FINNEY, R. F. The effects of nitrogen fertilization on the expression of slow-mildewing in knox wheat. **Phytopathology**, v. 67, p. 1051-1056, 1977.
- SILVA, M. R. J. et al. Silicon and manganese on the activity of enzymes involved in rice resistance against brown spot. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 5, p. 339-345, 2012.
- WANG, M. et al. Role of Silicon on Plant-Pathogen Interactions. **Front. Plant Sci.**, v. 8, p. 701, 2017.

13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O híbrido de milho P1680YH possui uma elevada suscetibilidade a mancha branca do milho (MBM), tornando necessário o manejo da doença. A utilização isolada de silício e *Azospirillum brasilense*, provavelmente induz as defesas da cultura do milho, pois reduz significativamente a severidade da *Pantoea ananatis* a campo e em casa de vegetação.

Entretanto, a campo, a redução da severidade da MBM, pelos indutores de defesa, não é eficaz quando comparado com a eficácia de controle dos produtos químicos. Os indutores de defesa se mostraram alternativas, quando utilizadas associadas aos produtos químicos, pois proporcionam um acréscimo no controle da doença, além da manutenção da produtividade da cultura.

A aplicação de silício na cultura do milho, isolado ou associado ao controle químico, resulta em um menor desenvolvimento da MBM, a campo e em casa de vegetação, auxiliando o controle químico e aumentando a produtividade da cultura.

A aplicação de *Azospirillum brasilense*, em tratamento de semente na casa de vegetação, diminui o desenvolvimento da *Pantoea ananatis*, inoculada artificialmente. No experimento a campo o *Azospirillum brasilense* reduziu a eficácia dos produtos químicos e resultou em uma maior severidade da MBM. Entretanto, a produtividade da cultura é compensada pelos efeitos benéficos do *A. brasilense* no metabolismo da cultura do milho.

Entre os produtos químicos testados o mancozebe apresentou a maior eficácia no controle da MBM, a campo e *in vitro*. A bactéria *Pantoea ananatis* apresenta uma moderada sensibilidade ao mancozebe. A *Pantoea ananatis* é insensível ao fungicida ciproconazol + picoxistrobina, resultando uma baixa eficácia no controle da MBM. O antibiótico casugamicina não resultou em um controle eficaz da MBM a campo, mesmo a bactéria apresentando uma baixa sensibilidade ao ingrediente ativo *in vitro*.

O cultivo de híbridos de milho, suscetíveis a mancha branca, durante o período de segunda safra, com condições ambientais favoráveis a MBM, torna indispensável o manejo da doença. O mancozebe é um fungicida eficaz no controle da bactéria *Pantoea ananatis* e provavelmente sobre os fungos oportunistas. A utilização de inoculantes, de baixo custo, como *Azospirillum brasilense* e micronutrientes, como silício, aumentam a resistência da cultura do milho a estresses bióticos e abióticos, reduzindo a severidade da MBM e aumentando a produtividade da cultura.

14 REFERÊNCIAS

- AMARAL, A. L. et al. Pathogenic fungi causing symptoms similar to *Phaeosphaeria* leaf spot of maize in Brazil. **Plant Disease**, v. 89, p. 44-49, 2005.
- AMARAL, A. L. et al. *Phoma sorghina*, a new pathogen associated with *Phaeosphaeria* leaf spot on maize in Brazil. **Plant Pathology**, v. 53, p. 259, 2004.
- AMBROSINI, A.; SOUZA, R.; PASSAGLIA, L. M. P. Ecological role of bacterial inoculants and their potential impact on soil microbial diversity. **Plant Soil**, v. 400, p. 193-207, 2016.
- AZAD, H. R.; HOLMES, G. J.; COOKSEY, D. A. A new leaf blotch disease of sudangrass caused by *Pantoea ananas* and *Pantoea stewartii*. **Plant Dis.**, v. 84, p. 973-979, 2000.
- BARTCHECHEN, A. et al. Efeito da inoculação de *Azospirillum brasiliense* na produtividade da cultura do milho (*Zea mays* L). **Campo Digital**, v. 5, n. 1, p. 56-59, 2010.
- BASHAN, Y.; DE-BASHAN, L. E. Reduction of bacterial speck (*Pseudomonas syringae* pv. tomato) of tomato by combined treatments of plant growth-promoting bacterium, *Azospirillum brasilense*, streptomycin sulfate, and chemo-thermal seed treatment. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, p. 821-829, 2002.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G.; BASHAN, L. E. *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997–2003). **Can. J. Microb.**, v. 50, p. 521-577, 2004.
- BEKTAS, Y.; EULGEM, T. Synthetic plant defense elicitors. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. 804, 2015.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. M. P. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 1044-1051, 2012.
- BONFETI, C. A. Localization of *Pantoea ananatis* inside lesions of maize White Spot Disease using transmission electron microscopy and molecular techniques. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 1, p. 063-166, 2008.
- BRACCINI, A. L. et al. Seed inoculation with *Azospirillum brasilense*, associated with the use of bio-regulators in maize. **Rev. Caatinga**, v. 25, n. 2, p. 58 - 64, 2012.
- BRITO, A. H. et al. Controle químico da Cercosporiose, Mancha-branca e dos Grãos Ardidos em milho. **Ceres**, v. 60, n. 5, p. 629-635, 2013.
- CARSON, M. L. Yield loss potential of *phaeosphaeria* leaf spot of maize caused by *Phaeosphaeria maydis* in the United States. **Plant Disease**, v. 89, p. 986-988, 2005.
- CARSON, M. L.; GOODMAN, M. M.; GLAWE, D. A. *Phaeosphaeria* leaf spot of maize in Florida. **Plant Disease**, v. 75, p. 968, 1991.

CERVELATTI, E. P. et al. Characterization of fungal isolates from pycnidia and pseudothecia from lesions of *Phaeosphaeria* leaf spot in maize. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 1, n. 3, p. 30-37, 2002.

CONABa. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília, n. 4, v. 5., Jan. 2018.

CONABb. Séries históricas de área plantada, produtividade e produção, relativas às safras 1976/77 a 2017/18 de grãos. 2018.

COSTA, R. R. G. F. et al. Efficiency of inoculant with *Azospirillum brasilense* on the growth and yield of second-harvest maize. **Pesqui. Agropecu. Trop.**, v. 45, n. 3, p. 304 – 311, 2015.

COTHER E. J. et al. An unusual stem necrosis of rice caused by *Pantoea ananas* and the first record of this pathogen on rice in Australia. **Australasian Plant Pathology**, v. 33, p. 495 - 503, 2004.

COUTINHO, T. A.; VENTER, S. N. *Pantoea ananatis*: an unconventional plant pathogen **Molecular plant pathology**, p. 10, n. 3, p. 325 - 335, 2009.

DEAN, J. L.; TODD, E. H. Sugarcane rust in Florida. **Sugar Journal**, v. 42, p. 10, 1979.

EPSTEIN E. The anomaly of silicon in plant biology. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 11–17, 1994.

FANTIN, G. M.; BALMER, E. Método de inoculação e evolução de sintomas da mancha foliar de *Phaeosphaeria maydis* em milho. **Summa Phytopathologica**, v. 23, p. 64-65, 1997.

FUGITA, M. et al. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in tomato. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 81, n. 8, p. 1657-1662, 2017.

FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Express**, n. 7, p. 153, 2017.

GARCION, C.; LAMOTTE, O.; MÉTRAUX, J. P. **Mechanisms of defence to pathogens: biochemistry and physiology**. In: WALTERS, D.; NEWTON, A.; LYON, G. (Ed.). Induced resistance for plant defence – a sustainable approach to crop protection. Oxford: Blackwell, p. 109-132, 2007.

GITAITIS, R. D. et al. Recovery of *Pantoea ananatis*, causal agent of center rot of onion, from weeds and crops in Georgia, USA. **Crop Prot.**, v. 21, p. 983 - 989, 2002.

GODOY, C. V., AMORIM, L.; FILHO, A. B. Alterações na fotossíntese e na transpiração de folhas de milho infetadas por *Phaeosphaeria maydis*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 209-215, 2001.

- GONÇALVES, R. M. et al. Capim-colchão: hospedeiro alternativo de *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, p. 692- 700, 2010.
- GOUSSAIN, M. M. et al. Efeito da aplicação de silício em plantas de milho no desenvolvimento biológico da lagarta-do-cartucho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotropical Entomology**, v. 31, n. 2, 2002.
- GUPTA, S., ARORA, D.K.; SRIVASTAVA, A.K. Growth promotion of tomato plants by rhizobacteria and imposition of energy stress on *Rhizoctonia solani*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, p. 1051-1058, 1995.
- HUNGRIA, M. et al. Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. **Plant and Soil**, v. 331, n. 1-2, p. 413-425, 2010.
- JULIATTI, F. C. et al. Eficácia da associação de fungicidas e antibióticos no manejo da mancha branca do milho e seu efeito na produtividade. **Biosci. J.**, v. 30, n. 6, p. 1622-1630, 2014.
- KAPPES, C. et al. Inoculação de sementes com bactéria diazotrófica e aplicação de nitrogênio em cobertura e foliar em milho. **Semina: Ciênc. Agrárias**, v. 34, n. 2, p. 527-538, 2013.
- LANA, M. C. et al. Inoculation with *Azospirillum*, associated with nitrogen fertilization in maize. **Rev. Ceres**, v. 59, n. 3, p. 399 – 405, 2012
- LANZA, F. E. et al. Etiology and epidemiological variables associated with maize resistance to white spot disease. **Journal of Plant Pathology**, v. 95, n. 2, p. 349-359, 2013.
- LOPES, M. T. G. et al. Controle genético da resistência à mancha-de-Phaeosphaeria em milho. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 605-611, 2007.
- MA, J. F. et al. Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 105, n. 9931 - 9935, 2008.
- MA, J. F., et al. An efflux transporter of silicon in rice. **Nature**, v. 448, p. 209–212, 2007.
- MA, J. F., et al. A silicon transporter in rice. **Nature**, v. 440, p. 688–691. 2006.
- MA, J. F.; YAMAJI, N. Silicon uptake and accumulation in higher plants. **Trends in Plant Science**, v. 11, n. 8, 2006.
- MANERBA, F. C. et al. Antibióticos no controle da Mancha Branca do Milho. **Comunicata Scientiae**, v. 4, n. 4, p. 361-367, 2013.
- MAZZUCHELLI, R. C. L.; SOSSAI, B. F.; ARAUJO, F. F. Inoculação de *Bacillus subtilis* e *Azospirillum brasilense* na cultura do milho. **Colloquium Agrariae**, v. 10, n. 2, p. 40 – 47, 2014.

- OLIVEIRA, E. et al. The phaeosphaeria leaf spot of maize in brazil: evidences of a new ethiologic agente. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v. 3, n. 3, p. 343-356, 2004.
- PACCOLA-MEIRELLES, L. D. et al. Detection of a bacterium associated with a leaf spot disease of maize in Brazil. **Journal Phytopathology**, v. 149, p. 275-279, 2001.
- PEDRO, E. S. et al. Nova evidência comprovando ser a cactéria *Pantoea ananatis* o agente etiológico da mancha-branca-do-milho (mancha-de-phaeosphaeria). **Boletim de pesquisa e Desenvolvimento**, Embrapa Milho e Sorgo, n. 80, 2013.
- PEREIRA, J. A. R. et al. Controle químico da mancha branca na cultura do milho. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2012.
- PEREIRA, S. C. et al. Aplicação foliar de silício na resistência da soja à ferrugem e na atividade de enzimas de defesa. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 3, p. 164-170, 2009.
- PINTO, N. F. J. A.; SANTOS, M. A.; WRUCK, D. S. M. Principais doenças da cultura do milho. **Informe Agropecuário**, v. 27, n. 233, p. 82 – 94, 2006
- POMINI, A. M.; ARAUJO, W. L.; MARSAIOLI, A. J. Structural elucidation and biological activity of acyl-homoserine lactones from the phytopathogen *Pantoea ananatis*. **J. Chem. Ecol.**, v. 32, p. 1769 – 1778, 2006.
- PORTUGAL, J. R.; PERES, A; GARÉ, L. M. *Azospirillum brasilenses* promotores incremento in corn production. **African jornal of agricultural research**, v. 11, n. 9, p. 1688 - 1698, 2016.
- POZZA, A. A. A. et al. Efeito do silício no controle e cercosporiose em três variedades de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, p. 185-188, 2004.
- RAID, R. N.; ANDERSON, D. L.; ULLOA, M. F. Influence of cultivar and amendmet of soil with calcium silicate slag on foliar disease development and yield of sugarcane. **Crop Protection**, v. 11, n. 1, p. 84-88, 1992.
- RANE M.S., PAYAK M.M., RENFRO B. L. The Phaeosphaeria leaf spot of maize. **Indian Phytopathological Society**, v. 3, p. 7-10, 1966.
- REGLINSKI, T.; DANN, E.; DEVERALL B. **Implementation of Induced Resistance for Crop Protection Induced Resistance for Plant Defense: A Sustainable Approach to Crop Protection**, 2. ed., 2014.
- RODRIGUES, F. A. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of silicone-mediated rice blast reistance. **Phytopathology**, v. 93, p. 535-546, 2003.
- SAIKIA, S. P. et al. A review on the role of *Azospirillum* in the yield improvement of non-leguminous crops. **Afr. J. Microbiol. Res.**, v. 6, n. 6, p. 1085-1102, 2012.

- SANTOS, G. R. et al. Influência de fontes de silício sobre a incidência e severidade de doenças e produtividade do arroz irrigado. **Bioscience Journal**, v. 19, n. 2, p. 65-72, 2003.
- SAUER, A. V. et al. Ice nucleation activity in *Pantoea ananatis* obtained from maize white spot lesions. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 4, p. 1659-1666, 2014.
- SAUER, A. V. et al. *Pantoea ananatis*, agente causal da mancha branca do milho, sobrevive epifiticamente sobre as folhas de milho. **XXVIII Congresso Nacional de Milho e Sorgo**, 2010.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. **Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal**. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular. Piracicaba: FEALQ, p.227-248, 2008.
- SILVA, M. R. J. et al. Silicon and manganese on the activity of enzymes involved in rice resistance against brown spot. **Tropical Plant Pathology**, v. 37, n. 5, p. 339-345, 2012.
- WANG, M. et al. Role of Silicon on Plant-Pathogen Interactions. **Front. Plant Sci.**, v. 8, p. 701, 2017.
- YASUDA, M. et al. Effects of colonization of a bacterial endophyte, *Azospirillum* sp. B510, on disease resistance in rice. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 73, n. 12, p. 2595-2599, 2009.
- ZANÃO JÚNIOR, L. A. et al. Rice resistant to brown spot mediated by silicone and its interaction with manganese. **Journal of Phytopathology**, v. 157, p. 73-78, 2009.