



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS GENÉTICOS VEGETAIS

João dos Anjos Verzutti Fonseca

Uso de polissacarídeos de shiitake (*Lentinula edodes*), babosa (*Aloe vera*) e acibenzolar-S-metílico como indutores de resistência a *Bipolaris maydis* no milho (*Zea mays*)

FLORIANÓPOLIS

2020

João dos Anjos Verzutti Fonseca

Uso de polissacarídeos de shiitake (*Lentinula edodes*), babosa (*Aloe vera*) e acibenzolar-S-metílico como indutores de resistência a *Bipolaris maydis* no milho (*Zea mays*)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero

Florianópolis

2020

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

Fonseca, João dos Anjos Verzutti

Uso de polissacarídeos de shiitake (*Lentinula edodes*),
babosa (*Aloe vera*) e acibenzolar-S-metílico como indutores
de resistência a *Bipolaris maydis* no milho (*Zea mays*) /
João dos Anjos Verzutti Fonseca ; orientador, Robson
Marcelo Di Piero, 2020.

56 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Florianópolis,
2020.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Indutores de
resistência. 3. Polissacarídeo. 4. *Bipolaris maydis*. I.
Marcelo Di Piero, Robson . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos
Genéticos Vegetais. III. Título.

João dos Anjos Verzutti Fonseca

Uso de polissacarídeos de shiitake (*Lentinula edodes*), babosa (*Aloe vera*) e acibenzolar-S-metílico como indutores de resistência a *Bipolaris maydis* no milho (*Zea mays*)

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Danila Souza Oliveira Coqueiro, Dr. (a)
Universidade Federal da Bahia

Ricardo Barbosa Filipini, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Valdir Marcos Stefenon, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares
Coordenador do Programa

Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero
Orientador

Florianópolis, 20 de outubro de 2020.

À Sabrina Lara Luz, dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família. Meus pais e irmã pelo incentivo e apoio durante toda minha trajetória de estudo. A minha companheira e amiga Sabrina Luz, por toda paciência e apoio nessa etapa.

A todos meus colegas de laboratório, em especial ao David Fernando Posso, Giana Paula Schaffler, Paula Astolfi e a Ana Galdino por todos os ensinamentos e apoio em todos os momentos. Aos Doutores Mateus Brusco de Freitas e Ricardo Barbosa Felipini por todo auxílio e conversas reflexivas.

Ao meu orientador, Professor Robson Marcelo Di Piero, pela oportunidade, exigência, paciência e por todos os ensinamentos passados.

Aos professores que aceitaram participar da banca, tanto do projeto como da dissertação, e pelas contribuições ao trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos Vegetais pelo suporte administrativo e aos professores por toda aprendizagem.

A Universidade Federal de Santa Catarina por ter proporcionado um ensino e pesquisa de qualidade.

A Deus, pela resiliência para finalizar mais esta jornada.

“(...) por que estudar, aperfeiçoar a capacidade intelectual, pensar com competência é tão esforçado quanto ter músculos, correr, nadar travessias (...)” (Clóvis de Barros Filho, 2014).

RESUMO

O milho (*Zea mays*) é o grão mais produzido no mundo, apresentando uma produção de 1.1 bilhões de toneladas na safra de 2019/20, desse montante 9% se atribui à produção no Brasil. Dentre os diversos fatores que podem acarretar na diminuição da produtividade do milho encontra-se a mancha causada por *Bipolaris maydis*, um dos fungos relacionados ao complexo de manchas foliares tratadas como helmintosporiose, comum nas principais regiões produtoras do país, podendo promover perdas de até 70% em condições de alta severidade. As principais medidas de controle para essa doença envolvem o uso de cultivares resistentes e a aplicação de fungicidas. Buscando medidas alternativas de controle com baixo impacto ambiental, o presente trabalho teve por objetivo estudar o uso de frações polissacarídicas extraídas de shiitake e babosa assim como o acibenzolar-S-metílico (ASM) como potenciais indutores de resistência no patossistema da mancha de bipolaris (*B. maydis*) em milho. Para isso foram realizados ensaios com plantas de milho de duas cultivares (P1630H e BM3063), mantidas sob condições de casa de vegetação em vasos de 2L contendo terra e turfa (3:1). As plantas, no estágio V4, foram pulverizadas com produtos de duas frações de polissacarídeo de shiitake (PS1 e PS2), nas doses 3 e 5 mg/mL, e duas de polissacarídeo de babosa (PB e PBR), nas doses 0.5, 0.75, 1.5 e 3.0 mg/mL, além do indutor comercial ASM, a 25, 50, 100 e 250 ppm, e a testemunha somente com água destilada. Após 3 ou 5 dias as plantas foram inoculadas com *B. maydis* (suspensão a $10^4 - 10^3$ esporos mL⁻¹) e colocadas em câmara úmida por 24 horas. As plantas tiveram sua severidade avaliada no quinto, décimo e decimo quinto dia após a inoculação (DAI) com o auxílio da escala diagramática adaptada. Foram realizados também ensaios para determinação da atividade das enzimas guaiacol peroxidase (GPX) e fenilalanina amônia-liase (FAL) em ambas as cultivares, tratadas com as frações de shiitake a 3.0 mg/mL. As frações PB e PBR e o ASM não reduziram significativamente a doença, ao passo que PS1 para ambas as cultivares, e o PS2 somente para o BM3063, nas diferentes doses, promoveram redução da severidade em torno de 60%. A fração PS2 aumentou a atividade de GPX em 60% para a cultivar P1630H, 3 dias após sua aplicação, e também aumentou a atividade de FAL em 200% para o P1630H e em 100% para o BM3063 72h após a inoculação. Assim conclui-se que as frações polissacarídicas de shiitake apresentam potencial para controlar a mancha de bipolaris em milho, alterando o metabolismo de defesa da planta.

Palavras-chave: Indutores de resistência. Polissacarídeo. *Bipolaris maydis*.

ABSTRACT

Maize (*Zea mays*) is the most produced grain in the world, with a production of 1.1 billion tons in the 2019/20, of which 9% is attributed to production in Brazil. One of the factors that can lead to a decrease in the productivity is the spot caused by *Bipolaris maydis*, one of the fungi related to the leaf spot complex treated as helminthporosis, common in the main producing regions of the country, which can promote losses of up to 70 % in conditions of high severity. The main control measures for this disease involve the use of resistant cultivars and the application of fungicides. Searching for alternative control measures with low environmental impact, the present study aimed to study the use of polysaccharide fractions extracted from shiitake and aloe as well as acibenzolar-S-methyl (ASM) as potential inducers of resistance in the bipolaris pathosystem (*B. maydis*) in maize. For this, tests were performed with maize plants from two cultivars (P1630H and BM3063), kept under greenhouse conditions in 2L pots containing soil and peat (3: 1). The plants, in the V4 stage, were sprayed with products of two fractions of shiitake polysaccharide (PS1 and PS2), in doses 3 and 5 mg / mL, and two of aloe polysaccharide (PB and PBR), in doses 0.5, 0.75 , 1.5 and 3.0 mg / mL, in addition to the commercial inducer ASM, at 25, 50, 100 and 250 ppm, and the control with distilled water only. After 3 or 5 days, the plants were inoculated with *B. maydis* (suspension at $10^4 - 10^3$ spores mL⁻¹) and placed in a humid chamber for 24 hours. The severity of the plants was evaluated on the fifth, tenth and fifteenth day after inoculation (DAI) with the aid of the adapted diagrammatic scale. Tests were also carried out to determine the activity of the enzymes guaiacol peroxidase (GPX) and phenylalanine ammonia lyase (FAL) in both cultivars, treated with the 3.0 mg / mL shiitake fractions. The PB and PBR fractions and the ASM did not significantly reduce the disease, while PS1 for both cultivars, and PS2 only for BM3063, in different doses, reduced the severity by around 60%. The PS2 fraction increased GPX activity by 60% for cultivar P1630H, 3 days after application, and also increased FAL activity by 200% for P1630H and 100% for BM3063 72h after inoculation. Thus it is concluded that the polysaccharide fractions of shiitake have the potential to control the spot of bipolar in maize, altering the defense metabolism of the plant.

Keywords: Resistance inductors. Polysaccharide. *Bipolaris maydis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Sintomas de *Bipolaris maydis* causados em folha de milho (A) e conídios do fungo (B) observados em microscópio óptico com aumento de 40x. Fonte: DA COSTA et al., 2014. 19
- Figura 2. Polissacarídeos utilizados no estudo. Em (A) polissacarídeo de babosa (PB) e polissacarídeo de babosa fração rosa (PBR), precipitados a partir da adição de etanol 92% no parênquima de reserva, na proporção de 3:1 (v/v); em (B), polissacarídeo de shiitake – fração 1 (PS1) e em (C), polissacarídeo de shiitake – fração 2 (PS2), precipitados a partir da adição de etanol 92% no extrato bruto de shiitake, na proporção de 1:1 (v/v) e 3:1 (v/v), respectivamente. 30
- Figura 3. Escala diagramática para determinação da severidade da doença causa por *Bipolaris maydis* em milho adaptada de Martinez, 2006 e Fernandes et al., 2011. 32
- Figura 4. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar BM3063 pulverizadas com água destilada, acibenzolar-s-metílico (ASM) a 25, 50 e 100 ppm, ou polissacarídeo de babosa (PB) a 0,5; 1,5 e 3,0 mg/mL 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^4 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). 36
- Figura 5. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água destilada, acibenzolar-s-metílico (ASM) a 25, 50 e 100 ppm, ou polissacarídeo de babosa (PB) a 0,5; 1,5 e 3,0 mg/mL 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 10 e 15 dias após a inoculação (DAI). 36
- Figura 6. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar BM3063 pulverizadas com água destilada ou fração polissacarídica de babosa (PB a 0,75; 1,5 e 3,0 mg/mL) autoclavada (aut.) ou submetida a diferentes tempos de aquecimento (15 e 30 min.) na temperatura fixa de 50°, aos 3 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 10 e 15 dias após a inoculação (DAI). 38
- Figura 7. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água destilada, polissacarídeo de babosa (PB) ou polissacarídeo de babosa fração rosa (PBR) a 1,5 mg/mL. As frações foram autoclavada (aut.) ou submetidas a diferentes tempos (15

e 30 min.) e temperaturas (50 e 100°C) de aquecimento e pulverizadas 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI)..... 38

Figura 8. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água destilada, polissacarídeo de babosa (PB) a 3,0 mg/mL, ou com os polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2) a 3,0 e 5,0 mg/mL, em intervalos de tempo (IT) de 3 ou 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). 39

Figura 9. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar BM3063 pulverizadas com água destilada, acibenzolar-s-metílico (ASM) a 250 ppm, ou com os polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2) a 3,0 e 5,0 mg/mL, em intervalos de tempo (IT) de 3 ou 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI). 39

Figura 10. Média da atividade enzimática de guaiacol peroxidase (A e C) e fenilalanina amônia-liase (B e D), em diferentes momentos após o tratamento com as diferentes frações de polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2), na dose de 3,0 mg/mL, aplicadas na cultivar P1630H. A seta indica o momento da inoculação do patógeno (3 dias após a aplicação dos produtos)..... 40

Figura 11. Média da atividade enzimática de guaiacol peroxidase (A e C) e fenilalanina amônia-liase (B e D), em diferentes momentos após o tratamento com as diferentes frações de polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2), na dose de 3,0 mg/mL, aplicadas na cultivar BM3063. A seta indica o momento da inoculação do patógeno (3 dias após a aplicação dos produtos)..... 41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Doenças registradas no Brasil para o princípio ativo acibenzolar-S-metílico (ASM)..	
.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AJ – Ácido jasmônico
- AS – Ácido salicílico
- ASM – Acibenzolar-S-metílico
- ATC – Ácido Trans-cinâmico
- BABA – Ácido D-L-aminobutírico
- BDA – Batata dextrose ágar
- BOD – Demanda bioquímica de oxigênio
- DAI – Dias após inoculação
- DAMPs – Padrões moleculares associados a dano
- DAT – Dias após tratamento
- EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
- FAL – Fenilalanina amônia-liase
- GPX – Guaiacol peroxidase
- H₂O₂ – Peroxido de hidrogênio
- HCl – Ácido clorídrico
- HR – Reação de Hipersensibilidade
- INA – Ácido 2,6-diclorisonicotínico
- MAMPs – Padrões moleculares associados a microorganismo
- MANE – Micoteca Anne Lore Schroeder
- MeJa – Metil jasmonato
- PB – Polissacarídeo de babosa
- PBR – Polissacarídeo de babosa – fração rosa
- PR – Relacionadas patogênese
- PS1 – Polissacarídeo de shiitake – fração 1
- PS2 – Polissacarídeo de shiitake – fração 2
- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- SAR – Resistencia sistêmica adquirida
- Si – Silício
- TMV – Vírus do mosaico do tabaco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	HIPÓTESE.....	16
3	OBJETIVOS	16
3.1	OBJETIVO GERAL.....	16
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1	A CULTURA DO MILHO.....	17
4.2	O COMPLEXO DA HELMINTOSPORIOSE E A MANCHA FOLIAR DE BIPOLARIS NO MILHO.....	18
4.3	INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E MECANISMOS DE DEFESAS EM PLANTAS	20
4.4	POTENCIAIS INDUTORES	22
4.4.1	Acibenzolar-S-Metílico (ASM)	22
4.4.2	Babosa (<i>Aloe vera</i>).....	24
4.4.3	Shiitake (<i>Lentinula edodes</i>)	26
5	MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1	CONDIÇÕES DE CULTIVO	28
5.2	OBTENÇÃO DO ISOLADO DE <i>Bipolaris maydis</i> , PRESERVAÇÃO E INOCULAÇÃO.....	28
5.3	OBTENÇÃO E PREPARO DO ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM) E DOS POLISSACARÍDEOS DE SHIITAKE (<i>Lentinula edodes</i>) E BABOSA (<i>Aloe vera</i>)	29
5.4	PROTEÇÃO DE MILHO CONTRA BIPOLARIS.....	30
5.4.1	Efeito do acibenzolar-S-metílico e da fração polissacarídica de babosa	31
5.4.2	Influência dos modos de preparo de PB	31
5.4.3	Efeitos das frações polissacarídicas de shiitake	31
5.5	ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE DEFESAS BIOQUÍMICAS.....	33
5.5.1	Atividade de guaiacol peroxidase	33

5.5.2	Atividade de fenilalanina amônia-liase.....	33
5.5.3	Determinação de proteína total e atividade enzimática	34
5.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	34
6	RESULTADOS	35
6.1	PROTEÇÃO DE PLANTAS DE MILHO	35
6.1.1	Efeito do acibenzolar-S-metílico e da fração polissacarídica de babosa	35
6.1.2	Influência dos modos de preparo de PB	37
6.1.3	Efeito das frações polissacarídicas de shiitake.....	37
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	40
7	DISCUSSÃO	42
8	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXO A.....	55

1 INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) tem seu centro de origem na América Central, local de onde foi difundido, domesticado e melhorado pela espécie humana através de processos de seleção espontânea ou intencional. O melhoramento na espécie busca aumento de produtividade, resistência a doenças, capacidade adaptativa, assim como, aumento na qualidade dos grãos destinados à silagem, à alimentação humana e à produção de farinhas, óleos, ração para aves, suínos e bovinos, e biodiesel (LERAYER et al., 2006; EL-DASH, CABRAL & GERMANI, 1994; DANTAS et al., 2006; ZANOTTO & BELLAVER, 1996; COSTA et al., 2005; OLIVEIRA, 1998; CRUZ et al., 2006).

Dentre os diversos fatores que podem acarretar na diminuição da produtividade, as doenças desempenham um papel chave, principalmente as de origem fúngica que atacam as folhas e que de modo geral, causam danos que levam à perda de área fotossintética o que vai refletir de maneira negativa na produtividade (COSTA et al., 2010; KIMATI et al., 2005; ALVIM et al., 2010).

A mancha foliar de *Bipolaris*, nome comum atribuído à doença foliar causada por *Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker (sinonímia *Helminthosporium maydis* Nisik. e *Myiake*) em milho, está amplamente disseminada nas regiões produtoras de milho no país. Ocasiona perdas significativas de até 70% do rendimento em cultivares de regiões subtropical ou temperada (SINGH & SRIVASTAVA, 2016; ALI et al., 2011).

Atualmente, a principal medida de controle utilizada para *B. maydis* é o uso de cultivares resistentes, a rotação de cultura e controle químico com fungicidas. O uso dessas medidas de maneira adequada e integrada é essencial para a efetividade de controle e garantia na durabilidade da resistência do material genético, por assim reduzir os riscos de selecionar isolados resistentes do patógeno (COTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2006; DA SILVA et al., 2009).

Dentro desse contexto, existe uma necessidade pela busca de tecnologias que contribuam no manejo de doenças dentro das novas tendências sustentáveis do mercado de desenvolvimento de produtos fitossanitários (BALBI-PEÑA et al., 2006; KUHN et al., 2010; FERREIRA NETTO, 2018). A indução de resistência é um fenômeno realizado de maneira intencional, visando a ativação dos mecanismos de defesas das plantas com a aplicação de substâncias, bióticas ou abióticas, que possam ser reconhecidas pelas células vegetais. (STANGARLIN et al., 2011; THAKUR & SOHAL, 2013).

Elicitores abióticos, como o ácido salicílico e seu análogo acibenzolar-S-metílico (ASM), podem ser considerados um caso clássico, pioneiro e de relativo sucesso na busca de manejos alternativos de doenças. Atualmente no Brasil o ASM, apresenta registro para 29 patossistemas de diferentes tipos de agentes patogênicos desde viroses, ferrugens, míldios, oídios, bactérias e até manchas foliares (ANVISA, 2018).

Já os elicitores bióticos, obtidos a partir de fontes como algas, plantas e microrganismos, são representados por polissacarídeos como acemanana, pectina, lentinana e quitina, entre outros, passíveis de reconhecimento e ativação de mecanismo de defesa em plantas (SBALHAT et al., 2015; LUIZ et al., 2017; WANG et al., 2013; AGUIAR et al., 2018).

Resíduos de cadeias produtivas como o cultivo de babosa e de cogumelo shiitake são fontes interessantes para obtenção de elicitores bióticos com uso potencial no controle de plantas, pois apresentam polissacarídeos como a acemanana e a pectina, majoritários em folhas de babosa, e a lentinana uma glucana, expressiva na composição da parede celular do shiitake (MINJARES-FUENTES et al., 2018; WASSER, 2005).

Polissacarídeos obtidos de folhas de babosa demonstraram ser eficientes na redução da severidade de doenças como a mancha bacteriana do tomateiro (*Xanthomonas gardneri*) e a mancha angular do morango (*X. fragariae*) e ativando enzimas de defesa como a peroxidase, superóxido dismutase, polifenoloxidase, glucanase e catalase (LUIZ, NETO & DI PIERO 2015; LUIZ et al., 2017).

O extrato aquoso de basidiocarpos de shiitake reduziu o desenvolvimento micelial e a germinação de esporos de *Exserohilum turcicum*, assim como a severidade de *E. turcicum* e *C. sublineolum* em cultivares de sorgo (PICCININ et al., 2010), enquanto o extrato aquoso do substrato gasto de shiitake suprimiu lesões causadas por *Pyricularia oryzae* em arroz, ocasionando o acúmulo de fitoalexinas e a alteração nos níveis de fitohormônios (ISHIHARA et al., 2019). No caso da fração polissacarídica do cogumelo, Aguiar et al. (2018) observaram a redução significativa de severidade da mancha bacteriana em tomateiro causada por *Xanthomonas gardneri*.

Dessa forma, o presente trabalho tem o objetivo de obter informações iniciais quanto a efetividade dos elicitores ASM e polissacarídeos de babosa e shiitake, na redução da mancha de bipolaris assim como os fatores de variação que possam estar envolvidos em seu processo de indução de resistência, como dependência do genótipo, intervalo de tempo, ausência de dose dependência, e seus mecanismos de defesa potencialmente ativados.

2 HIPÓTESE

Os polissacarídeos de shiitake e da babosa e o indutor comercial acibenzolar-S-metílico ativam mecanismos bioquímicos de defesa do milho, atuando na redução da severidade da mancha foliar de *bipolaris*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo estudar o uso potencial de polissacarídeos de shiitake (*Lentinula edodes*) e babosa (*Aloe vera*) e do acibenzolar-S-metílico como indutores de resistência no patossistema da mancha de *bipolaris* (*B. maydis*) no milho (*Z. mays*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar qual dos indutores propostos tem a capacidade de reduzir a severidade da mancha de *bipolaris*.

Estabelecer uma dose e um período de ação potencial para os indutores.

Analisar a ativação de mecanismos de defesa bioquímicos com os indutores que reduzirem significativamente a mancha de *bipolaris*.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea Mays*), pertencente à família das gramíneas, tem como seu centro de origem a América Central, região onde hoje se encontra o México e a Guatemala. A partir desse centro, o homem promoveu a domesticação da espécie por meio de seleção visual no campo, considerando características como produtividade, resistência a doenças, capacidade de adaptação, dentre outras, dando origem às variedades hoje conhecidas (LERAYER et al., 2006). Dentre os possíveis usos do milho, temos: a produção de farinhas, óleos, ração para aves, suínos e bovinos, biodiesel, silagem e alimentação humana (EL-DASH, CABRAL & GERMANI, 1994; DANTAS et al., 2006; ZANOTTO & BELLAYER, 1996; COSTA et al., 2005; OLIVEIRA 1998; CRUZ et al., 2006).

Tal variabilidade de uso reflete para o milho como o grão mais produzido mundialmente, atingindo produção média de aproximadamente 1,1 bi toneladas nas safras de 2018/19 a 2019/20. O Brasil enquadra-se como o terceiro maior produtor, contribuindo com aproximadamente 101 mi toneladas, representando 9% do total mundial e ficando atrás somente dos Estados Unidos e China, com produções de 356 mi (32%) e 260 mi (23%) toneladas respectivamente (FIESP, 2020ab). E ainda assim considerado uma commodity em ascensão e economicamente muito expressiva no mercado internacional (FAO, 2009; BONO et al., 2008).

Do total produzido do grão no Brasil, as regiões mais expressivas são o Centro-Oeste, Sul e Sudeste, participando com 40 mi, 19 mi e 11 mi toneladas respectivamente. O estado de Santa Catarina apresenta uma média de produção de 3 mi toneladas ano, em uma área plantada de aproximadamente 385 mil hectares. Dados médios das safras 2013/14 a 2017/18 demonstram as microrregiões de Criciúma, Xanxerê, Tabuleiros, Canoinhas, Joinville, Concórdia, São Miguel do Oeste e Campos de Lages como as mais expressivas no estado quanto à produção de milho ficando entre 520 mil e 211 mil toneladas (EPAGRI/CEPA, 2018).

Destas Xanxerê, Concórdia e São Miguel do Oeste assim como todo o oeste do estado de Santa Catarina é caracterizado por 74% de produtores de agricultura familiar em sistemas que apresentam a combinação sinérgica de culturas vegetais e produção animal, como é o caso do milho e a produção de frangos, suínos e bovinos sendo o consumo animal responsável por 93% da demanda de milho no estado (FERRARI, 2003; EPAGRI/CEPA, 2018).

Na agricultura familiar é comum o uso de cultivares crioulas de milho, as quais possuem alta diversidade fenotípica e genotípica. Além de conservar a variabilidade da espécie,

o uso de material crioulo ajuda na preservação de costumes e preferências das famílias ligadas a características conforme a finalidade de uso do milho (CRUZ et al., 2006; ARAÚJO & NASS, 2002; DE LIMA et al., 2020).

Dentre os diversos fatores que podem acarretar na diminuição da produtividade do milho, as doenças desempenham um papel chave (COSTA et al., 2010), principalmente as de origem fúngica que atacam folhas havendo uma redução direta de área fotossintética e assim refletindo de maneira negativa na produtividade (KIMATI et al., 2005; ALVIM et al., 2010).

4.2 O COMPLEXO DA HELMINTOSPORIOSE E A MANCHA FOLIAR DE BIPOLARIS NO MILHO

Helminthosporiose é o nome comum atribuído a uma série de doenças foliares ocorrentes em gramíneas causadas por diferentes patógenos, os quais também já foram taxonomicamente agrupados em um gênero único (*Helminthosporium*).

Porém estudos posteriores sugeriram a divisão em mais gêneros como *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera* e *Exserohilum* (SIVANESAN et al., 1987), baseando-se em suas diferenças morfológicas e moleculares (ALCORN, 1988; WEIKERT-OLIVEIRA et al., 2002; MANAMGODA et al., 2014).

Para a classificação de indivíduos nos distintos gêneros propostos de *Bipolaris*, *Drechslera* e *Exserohilum* pode se levar em consideração características morfológicas quanto a forma do conídio, ausência ou intensidade da protuberância do hilo, a direção basal de crescimento do tubo germinativo e a antogênese dos septos (ALCORN, 1988). O gênero *Curvularia* só pode ser caracterizado e distinguindo do gênero *Bipolaris* através de trabalhos recentes de caracterização genética, sendo anteriormente não encontradas reais diferenças entre os dois (MANAMGODA et al., 2014; SIVANESAN et al., 1987).

A mancha foliar de *Bipolaris*, nome comum atribuído à doença foliar causada por *Bipolaris maydis* (Nisik.) Shoemaker (sinonímia *Helminthosporium maydis* Nisik. e Myiake) em milho, está disseminada nas regiões produtoras do país. Ocasiona perdas significativas variando de 11,7% a 70% de rendimento em cultivares de regiões subtropical ou temperada (SINGH & SRIVASTAVA, 2016; ALI et al., 2011).

Os sintomas dessa doença são caracterizados por lesões alongadas, de cor marrom claro a marrom castanho, com bordos paralelos, não frequente apresentando coloração mais escura no centro, medindo entre 0,2 a 0,6 cm de largura e 0,5 a 2,0 cm de comprimento (Figura 1A). Os conídios do *B. maydis*, são curvos, com ausência de hilo protuberante, com seu tubo

germinativo emergente pelo hilo e comumente nos dois polos, apresentando dimensões que podem variar de 10-17 x 30-115 μm , possuem de 3 a 13 septos com antogênese central (Figura 1B). As condições ideais para o seu desenvolvimento são em ambientes com alto índice de umidade e temperaturas em torno de 20°C a 32°C (KIMATI et al., 2005; FILHO, 2007; FILHO et al., 2012; DA COSTA et al., 2014).

Entretanto, a distinção dos sintomas causados entre os diferentes agentes patogênicos de Helminthosporiose no campo é rara ou impraticável (BARBEDO, 2016), fazendo assim, o entendimento dessas doenças como um complexo, mais adequado e próximo de situações reais para tomadas de decisão no controle.

Figura 1. Sintomas de *Bipolaris maydis* causados em folha de milho (A) e conídios do fungo (B) observados em microscópio óptico com aumento de 40x. Fonte: DA COSTA et al., 2014.



Atualmente, a principal medida de controle utilizada para *B. maydis* é o uso de cultivares resistentes. Na safra de 2020, no Brasil, havia o registro de 131 cultivares comerciais de milho comerciais, todos apresentando tecnologias de resistência transgênica, com os mais variados níveis de resistência a *B. maydis* (FILHO & BORGHI, 2020; DA COSTA et al., 2018).

Recomenda-se também a adoção de práticas de rotação de cultura com plantas não hospedeiras, contudo essa medida pode ser ineficiente dado a possibilidade do plantio de segunda safra do milho. Deste modo, o controle químico com fungicidas se torna cada vez mais comum e ineficiente quando não utilizado de maneira criteriosa (COTA et al., 2013; DA COSTA et al., 2014; DA SILVA et al., 2009).

Há somente um produto comercial registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para *Helminthosporium maydis*, nome antigo utilizado para *B. maydis*, sendo destinado para o tratamento de sementes. O produto contém dois ingredientes ativos

pertencentes aos grupos químicos dos benzimidazóis e dimetilditiocarbamatos. Já o registro para um outro agente causal do complexo, *Exserohilum turcicum*, nos últimos 7 anos aumentou de 11 para 27 produtos comerciais, em sua maioria pertencentes ao grupo químico dos triazóis (AGROFIT, 2020).

Esse cenário incentiva a busca de novas tecnologias que contribuam no manejo de doenças e que possibilitem o reaproveitamento de resíduos de outras cadeias produtivas, assim como o uso de moléculas de baixo impacto ambiental (BALBI-PEÑA et al., 2006; KUHN et al., 2010; FERREIRA NETTO, 2018).

4.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA E MECANISMOS DE DEFESAS EM PLANTAS

A indução de resistência é um fenômeno realizado de maneira intencional, visando a ativação dos mecanismos de defesas das plantas com a aplicação de substâncias bióticas ou abióticas, que possam ser reconhecidas pelas células vegetais. Os polissacarídeos obtidos a partir de fontes renováveis como o exoesqueleto de crustáceos, algas, plantas e microrganismos, constituem-se em possíveis indutores pois tais moléculas apresentam padrões similares aos polissacarídeos constituintes de microrganismos patogênicos (MAZARO et al., 2012; SBAIHAT et al., 2015; LUIZ, NETO & DI PIERO, 2015). Tal aplicação baseia-se no fenômeno da resistência induzida ocorrente em plantas, descrita inicialmente por Ross (1961) ao observar a redução dos sintomas do vírus do mosaico do tabaco (TMV) inoculado em folhas do terço superior, após uma inoculação anterior do vírus nas folhas inferiores de plantas de tabaco. Desde então, diversos outros estudos foram realizados na busca de contribuir com a compreensão e a descrição do fenômeno de indução de resistência em maiores níveis de complexidade (HAMMERSCHMIDT & KUC, 1995; HAMMERSCHMIDT, 1999; HAMMERSCHMIDT, MÉTRAUX, & VAN LOON, 2000) assim como os desafios envolvidos em sua aplicação em situações de campo (WALTERS et al., 2005; WALTERS & FOUNTAINE, 2009).

A resistência total ou parcial das plantas a algum agente patogênico está ligada com a capacidade do hospedeiro em evitar ou dificultar os processos de infecção e colonização realizados pelo patógeno (GOODMAN et al., 1986). Há mecanismos que podem conferir certo grau de resistência dependente do patógeno e podem ser ativados através de um processo de indução desencadeado pela própria percepção do patógeno ou com a aplicação de algum composto que contenha uma molécula elicitora. Essas substâncias ou moléculas podem ser de origem biótica ou abiótica, e serem reconhecidas pela planta, ativando as defesas antes do

contato com o patógeno propriamente dito e assim gerando dado grau de resistência temporário (PASCHOLATI & DALIO, 2011; PASCHOLATI et al., 2010).

A defesa das plantas para fins didáticos pode ser classificada em mecanismos estruturais ou bioquímicos, pré ou pós formados a partir da interação com o patógeno. Sendo os mecanismos entendidos como pós formados passíveis de ativação por elicitores (STANGARLIN et al., 2011; THAKUR & SOHAL, 2013).

Como exemplo de mecanismos estruturais, pós formados, temos a síntese de halos e papilas frequentemente associados a gramíneas em resposta à presença fúngica, como nos patossistemas trigo - *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, cevada – *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, milho – *Exserohilum triticum* - *Bipolaris maydis* (KIMATI et al., 2005). Outro mecanismo estrutural observado em plantas de milho foi o acúmulo de calose após o contato com o patógeno *Bipolaris maydis* (MORRIS et al., 1998).

Já em relação aos mecanismos pós-formados bioquímicos se tem o acúmulo de espécie reativas de oxigênio (ROS), atuando de maneira direta e na sinalização da resposta de defesa (STANGARLIN et al., 2011; LEHMANN et al., 2015), o aumento nos níveis de fitoalexinas e a expressão de proteínas relacionadas à patogênese (Proteínas-PR), que estão divididas em grupos ou famílias PR (PASCHOLATI & DALIO, 2011; STANGARLIN et al., 2011).

Uma enzima de relevância para estudos de mecanismos de defesa de plantas são as peroxidases pertencentes à família PR-9. São elas as responsáveis por acelerar a oxidação de substâncias (fenóis) precursores na síntese de lignina (SILVA et al., 2008). As peroxidases podem criar uma barreira física catalisando a ligação cruzada de compostos da parede celular em resposta a diferentes estímulos, como ferimentos, interações com patógenos e agressões climáticas. Este processo também ocorre normalmente no desenvolvimento da parede celular durante o crescimento e a senescência (PASSARDI, et al. 2005).

Já a fenilalanina amônia-liase (FAL) é uma enzima central na biossíntese de flavonoides e da lignina a partir da atuação no processo de desaminação da fenilalanina, formando o ácido cinâmico. O aumento na atividade enzimática da FAL, associado a estresses bióticos ou abióticos em vegetais, pode sinalizar o aumento na biossíntese de lignina, que atua como barreira contra a infecção microbiana e também pode promover aumento na concentração de produtos de oxidação de fenólicos, alterando a concentração de auxinas por causa da presença de oxidases (MARRIOTT, BEEN & PERKINS, 1978).

Não está claro se há relação direta entre a natureza da molécula elicitora com uma resposta padrão de mecanismos induzidos em relação aos diferentes grupos de plantas e agentes patogênicos. Contudo são comumente utilizados como elicitores abióticos substâncias como

silício (Si), ácido salicílico (AS), ácido D-L-aminobutírico (BABA), quitosana, cloreto férrico, fosfato de potássio dibásico e monobásico, acibenzolar-S-metílico (ASM), ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA), ácido jasmônico (AJ), metil jasmonato (MeJa), ácido graxos ou luz em comprimento de onda específicos e como elicitores de natureza biótica têm-se o uso de extratos, filtrados ou suspensões provenientes de parte ou todo de um organismo vivo seja inseto, alga, fungo, bactéria ou planta (KUHN, 2007; WALTERS, RATSEP & HAVIS, 2013; THAKUR & SOHAL, 2013). Tal potencial, para fontes de indutores bióticos, está relacionado com o conceito dos padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) que tais fontes podem apresentar em comum com microrganismos patogênicos, como por exemplo quitina, glucana e lipopolissacarídeo (COOPER, 2010).

Indutores de origem biótica são fortes candidatos em pesquisas relacionadas à indução de resistência pelo fato de se adequarem novas tendências do mercado de desenvolvimento de produtos fitossanitários, como a utilização de compostos de menor impacto ao ambiente e a saúde humana como também a reutilização de resíduos de outras cadeias produtivas (BALBIPEÑA et al., 2006; KUHN et al., 2010; FERREIRA NETTO, 2018). Entretanto faltam informações em relação a fatores que afetam o processo de indução de resistência como o genótipo do hospedeiro, as condições ambientais, o gasto de energia, a concentração do indutor e seu intervalo de aplicação (WALTERS, RATSEP & HAVIS, 2013).

4.4 POTENCIAIS INDUTORES

4.4.1 Acibenzolar-S-Metílico (ASM)

O composto acibenzolar-S-metílico (ASM) pertence ao grupo químico dos Benzotiadiazóis e está classificado como ativador de planta de classe toxicológica 5 (improvável de causar dano agudo) e classe ambiental III (Perigoso ao meio ambiente). Atualmente no Brasil há três produtos comerciais registrados que apresentam o ASM como princípio ativo: Bion[®], Actigard[®] e Inssimo[®]. O registro ocorre para 15 culturas como algodão, batata, cacau, cebola, citros, crisântemo, feijão, eucalipto, melancia, melão, tomate e trigo. Totalizando 28 patossistemas de diferentes tipos de agentes patogênicos podendo se listar um vírus, duas ferrugens, três míldios, quatro oídios, onze bactérias e sete agentes causais de manchas foliares (Tabela 1) (ANVISA, 2018; ADAPAR, 2018, AGROFIT, 2020).

Tabela 1. Doenças registradas no Brasil para o princípio ativo acibenzolar-S-metílico (ASM).

Cultura	Agente causal	Doença	Nome comum
Algodão	<i>Ramularia areola</i>		Falso-oidio; Ramulária
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>malvacearum</i>		Crestamento-bacteriano; Mancha-angular
Alstroeméria	<i>Alternaria</i> sp.		Pinta Preta
	<i>Phytium</i> spp.		Podridão-radicular
Batata	<i>Phytophthora infestans</i>		Mela; Requeima
Cacau	<i>Crinipellis pernicioso</i>		Vassoura-de-bruxa
Cebola	<i>Peronospora destructor</i>		Cinza; Mildio
Citros	<i>Xylella fastidiosa</i>		Amarelinho; Clorose-variegada-dos-citros
Crisântemo	<i>Erwinia chrysanthemi</i>		Murcha-bacteriana; Podridão-bacteriana-do-talo
	<i>Puccinia horiana</i>		Ferrugem-branca
Eucalipto	<i>Xanthomonas axonopodis</i>		Bacteriose
	<i>Pseudomonas cichori</i>		Bacteriose
Feijão	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>		Canela-preta; Crestamento-bacteriano-comum
	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i>		Antracnose
	<i>Bean Golden Mosaic Virus</i>		BGMV; Mosaico dourado
Gérbera	<i>Peronospora sparsa</i>		Mildio
Melancia	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>		Mancha-aquosa da melancia
Melão	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>		Mancha-aquosa
Rosa	<i>Peronospora sparsa</i>		Mildio
	<i>Sphaerotheca pannosa</i>		Branco-da-roseira; Oídio
	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>		Mancha-bacteriana
Tomate	<i>Phytophthora infestans</i>		Mela; Requeima
	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>		Pinta-bacteriana
	<i>Alternaria solani</i>		Mancha-de-Alternária; Pinta-preta-grande
Trigo	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>		Cinza; Oídio

Fonte: AGROFIT, 2020.

Ainda assim, o ácido salicílico e seus análogos funcionais vêm promovendo redução de doenças em diversas culturas e sendo extensivamente estudado como um indutor de resistência estando entre os mais importantes indutores abióticos (BENELLI et al., 2004; DANNER et al., 2008; MANDAL et al., 2008; OOSTENDORP et al., 2001 RADWAN et al., 2008).

Buonaurio et al. (2002) demonstraram que o ASM tem ação indutora em plantas de pimentão atacadas por *Xanthomonas campestris*, agente causal da mancha bacteriana, apresentando maior eficácia na redução da severidade (cerca de 67%) quando as plantas foram pulverizadas de 6 a 7 vezes com uma mistura de acibenzolar-S-metílico e hidróxido de cobre (2,5 + 40 g L⁻¹ de ingrediente ativo). De modo similar, Soyly, Baysal & Soyly (2003) verificaram a ação indutora de resistência do ASM em plantas de tomateiro sob ataque de cancro bacteriano causado por *Clavibacter michiganensis* e assim apresentando reduções na severidade acima de 75%.

Em termos de ativação de mecanismos de defesa, Sobrinho et al. (2006) relataram o aumento na atividade das enzimas fenilalanina amônia-liase (FAL) e peroxidase associado a aplicação de ASM, em plantas de feijão-caupi *Vigna unguiculata* que foram desafiadas por *Macrophomina phaseolina*, agente causal da podridão cinzenta do caule. Araujo et al. (2015) estudaram a seca-da-mangueira causada por *Ceratocystis fimbriata* e constataram que o ASM

induziu respostas de defesa, onde a concentração de compostos fenólicos e de alcalóides foram elevadas nos estágios iniciais da infecção fúngica nas plantas tratadas com o indutor. Boava et al. (2010) demonstraram o aumento na atividade de quitinases e peroxidases ao tratar clones de eucalipto com ASM 48h após a inoculação com o fungo *Puccinia psidii*, enquanto Kuhn (2007) observou em plantas de feijoeiro a ocorrência da indução de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em função da aplicação de ASM, que foi associada ao aumento na atividade de peroxidase, quitinase, β -1,3-glucanase e proteases, aumento da síntese de lignina, redução no teor de fenóis e aumentos no teor de proteínas solúveis e de açúcares redutores nas folhas. Foi ainda verificado que o ASM alterou o metabolismo, direcionando os fotoassimilados para investir em defesas, causando redução de produtividade. Egel et al. (2018), em seu trabalho com *Erwinia tracheiphila* causadora da murcha bacteriana do melão, demonstraram efetividade do ASM na redução da severidade da doença sob condições de incidência moderada ou alta, porém quando a incidência era baixa, o ASM acarreta na perda de rendimento do melão.

A redução da severidade causada por ASM em outros patossistemas do milho foi descrita até o momento para doenças causadas por *Peronosclerospora sorghi*, *Pantoea ananatis* e *Exserohilum turcicum* mas sem efeitos para *Cercospora* spp. (MORRIS, et al., 1998; NEUMANN et al., 2016; BARROS, 2011).

4.4.2 Babosa (*Aloe vera*)

A babosa, nome científico *Aloe vera* (L.) Burm. f. (sinonímia *Aloe barbadensis* Miller), pertence ao gênero *Aloe* com representantes predominantemente encontrados na África (PARENTE et al., 2013; DAGNE et al., 2000).

Caracterizada como planta perene, possui um bulbo que desabrocha cerca de cinquenta folhas suculentas, cerosas, de cor verde, com margem serrada e levemente espinhosa, com o formato de lanças que crescem numa formação de roseta, suas folhas podem crescer até 75 cm e pesar até 2,3 kg. A região central das folhas está preenchida por parênquima de reserva, de aspecto mucilaginoso, constituindo de 99,3% de água e 0,7% de sólidos predominantemente manose, glicose e galactose. O polissacarídeo predominante em folhas de babosa é a acemanana, o qual desempenha papel na retenção de água e reserva, consistindo em repetições de unidades de tetrassacarídeos de manoses acetilas e glicoses na cadeia principal ligadas por β -1,4 e também pode apresentar cadeias laterais de unidades galactose ligadas ao C-6 de manoses. A pectina é o segundo polissacarídeo mais expressivo nas folhas de babosa sendo um

dos polímeros presentes na parede celular de células vegetais, composta principalmente por ácido galacturônico formando cadeias ligadas por α -1,4 intercaladas com resíduos de rarnose ligadas a β -1,2, sendo pontos de ramificação para cadeias laterais de açúcar neutro (YATES, 2006; PANDEY & MISHRA, 2010; MINJARES-FUENTES et al., 2018).

O uso de *Aloe* remonta a milhares de anos para fins alimentícios, produção de medicamentos e cosméticos e como fitoterápico em particular para o tratamento de constipação, queimaduras e doenças. Devido a tais propriedades medicinais atribuídas à babosa, estudos foram realizados para se determinar os compostos químicos presentes em folhas e raízes de espécies de *Aloe*. Dessa forma, mais de 130 compostos foram descritos (DAGNE et al., 2000; BACH et al., 2007; PARENTE et al., 2013).

Harish et al. (2008), trabalhando em condições *in vitro* com o fungo *Bipolaris oryzae* causador da mancha marrom no arroz, verificaram a inibição da germinação dos esporos do fungo em 55% com o uso de extratos brutos de folhas de babosa, os quais tem demonstrado atividade antifúngica a *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum coccodes*, *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Alternaria alternata*, *Drechslera hawaiiensis* e *Penicillium digitatum*. E o extrato etanólico efeito inibitório a *F. oxysporum*, *Candida albicans*, *A. niger* e *A. fumigatus* (DE RODRIGUEZ et al., 2005; SITARA, HASSAN & NASEEM, 2011; DANISH et al., 2020).

Essas substâncias também têm sido exploradas em estudos de defesas de plantas, como potenciais elicitores, em alguns patossistemas. Godard et al. (2009) verificaram ativação dos mecanismos de defesa em plantas de uva contra o ataque de míldio causado por *Plasmopara viticola*, como o acúmulo de fitoalexinas e atividade de peroxidase com o uso de extratos ricos na substância emodina pertencente ao grupo químico das antraquinonas. Já Luiz, Neto e Di Piero (2015) demonstraram a eficiência na redução da severidade da mancha bacteriana causada por *Xanthomonas gardneri* no tomateiro com o uso de polissacarídeos provenientes do parênquima da babosa, com reduções de severidade acima de 85% e também a ocorrência do aumento da atividade de peroxidase, polifenoloxidase e glucanase. Em um trabalho mais recente, Luiz et al. (2017) verificaram a supressão quase completa da mancha angular de *X. fragariae* em morango quando as folhas foram tratadas com os polissacarídeos da babosa e o incremento na atividade de enzimas como superóxido dismutase, catalase e peroxidase.

4.4.3 Shiitake (*Lentinula edodes*)

Lentinula edodes (Berk.) Pegler (1983) é um fungo popularmente conhecido como “shiitake”, pertence à classe dos basidiomicetos, ordem agaricales, e apresenta corpos de frutificação carnosos e efêmeros, vulgarmente chamados de cogumelos (MASSOLA & KRUGNER, 2005). É um fungo decompositor primário por decompor resíduos vegetais que ainda não foram deteriorados, ocorrendo em troncos de espécies arbóreas caducifólias (PAULA, TARSITANO & GRACIOLLI, 2001). O micélio é septado, contendo grampos de conexão para manter a sua condição binucleada, sua parede celular composta de monômero de quitina e glucana ligados entre si por ligações glicosídicas. Sua reprodução ocorre através de esporos exógenos (basidiósporos) formados sobre uma hifa especial denominada basídia (MASSOLA & KRUGNER, 2005).

A domesticação da espécie *L. edodes* pelo homem data de aproximadamente 1.000 anos. O shiitake é originário do nordeste asiático, região onde hoje se encontra a China, foi introduzido no Japão por intermédio de cultivadores chineses e posteriormente nos EUA e Europa. É o segundo cogumelo mais consumido no mundo, podendo ser cultivado em sistemas extensivos como a produção em toras de eucalipto ou através de métodos axênios de produção (PAULA, TARSITANO & GRACIOLLI, 2001). Estima-se que no Brasil a produção de diferentes tipos de cogumelos comestíveis alcance 12.000 toneladas “in natura”. Responsável por aproximadamente 13% desse total, o shiitake é o terceiro cogumelo mais produzido e consumido no Brasil ficando atrás apenas do champignon e do shimeji. Apesar de pequena, a produção de cogumelos no Brasil desempenha um importante papel social como alternativa de renda principalmente para os micros e pequenos produtores da agricultura familiar (ANPC, 2013). O interesse no consumo do shiitake é atribuído a seu rico caráter nutricional, apreciável sabor e suas propriedades medicinais relacionadas aos polissacarídeos como a lentinana, uma α -glucana produzida durante o crescimento micelial ou isolada do basidiocarpo por extração aquosa e etanólica (HATVANI, 2001; PICCININ et al., 2010; WASSER, 2005).

É crescente o número de experimentos envolvendo as substâncias encontradas no basidiocarpo de *L. edodes* cujo potencial tem sido explorado em sua atividade antimicrobiana e como indutores de resistência em plantas atacadas por fungos, vírus e bactérias.

Fiori-Tutida et al. (2007) constataram a inibição na germinação de esporos de *Puccinia recôndita* f. sp. *tritici*, na ordem de 52,4% com o uso de extratos de *L. edodes*. Piccinin et al. (2010) demonstraram que o extrato aquoso de shiitake a 2% (v/v) reduziu o desenvolvimento

micelial e a germinação de esporos de *E. turcicum*, além de reduzir significativamente a severidade das doenças causadas por *E. turcicum* e *C. sublineolum* em cultivares de sorgo, quando aplicado 48 h antes da inoculação com os patógenos. Tolaini et al. (2010) e Wang et al. (2013) utilizaram filtrados de cultura de *L. edodes* e observaram a ocorrência no atraso da germinação de esporos de *Penicillium expansum*, em associação de sinergismo com leveduras já utilizadas em tratamentos de pós colheita como a *Cryptococcus laurentii* e a *Pichia membranifaciens*.

Di Piero et al. (2006), com a utilização de extratos aquosos de *L. edodes*, observaram a redução significativa na severidade da antracnose provocada por *Colletotrichum lagenarium* em plantas de pepino, assim como o aumento da atividade de peroxidases. No patossistema *Ralstonia solanacearum* – tomate, extratos aquosos de shiitake promoveram o aumento na atividade enzimática da peroxidase e quitinase 24h após a inoculação com a bactéria e redução de 66% na incidência da murcha (SILVA, PASCHOLATI & BEDENDO, 2007).

Aguiar et al. (2018) constataram a redução significativa de severidade da mancha bacteriana em tomateiro após a aplicação foliar da fração polissacarídica extraída de *L. edodes*. Já Ishihara et al. (2019) demonstram a supressão no desenvolvimento de lesões causadas por *Pyricularia oryzae* em arroz, após a aplicação do extrato aquoso do substrato de cultivo gasto de *L. edodes*, junto ao acúmulo de fitoalexinas e a alteração nos níveis de fitohormônios como o ácido salicílico e jasmônico.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os experimentos foram realizados em casa de vegetação e analisados no Laboratório de Fitopatologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina.

Nos experimentos foram utilizadas as variedades comerciais P1630H, híbrido simples, da Du Pont Pioneer[®] e a BM3063, híbrido triplo da Biomatrix[®], ambas consideradas suscetíveis ao *B. maydis*.

Foram semeadas quatro sementes em vasos plásticos (2 litros), contendo mistura de solo fértil e substrato turfa (2:1). Depois de 7 dias, aproximadamente, realizou-se o desbaste mantendo de duas a três plântulas por vaso, conforme o tipo do ensaio, compondo a unidade amostral com 6 repetições por tratamento.

As temperaturas mínimas e máximas foram tomadas diariamente e as plantas irrigadas, nutridas e aleatorizadas conforme a necessidade, durante a realização dos experimentos.

5.2 OBTENÇÃO DO ISOLADO DE *BIPOLARIS MAYDIS*, PRESERVAÇÃO E INOCULAÇÃO

O isolado de *B. maydis* utilizado no trabalho foi o acesso de código MANE 188 que se encontra depositado em Castellani na Micoteca Anne Lore Schroeder, localizada no Laboratório de Fitopatologia da UFSC, o qual foi isolado a partir de amostras foliares sintomáticas coletadas da Fazenda Experimental da Ressacada – UFSC e caracterizado molecularmente pela empresa Helixxa Serviços Genômicos[®] com *primers* da região ITS1-ITS2 (SCHAUFFLER, 2019).

Para a obtenção de esporos de *B. maydis* o fungo foi mantido em placas de Petri com BDA, incubadas em sala de crescimento (25°C – 12h de fotoperíodo) por aproximadamente 15 dias. Após esse período, foram transferidos 4 discos de micélio para um Erlenmeyer de 125 ml contendo 30g de grãos de sorgo e 30mL de água destilada, previamente autoclavado por duas vezes durante 30min no intervalo de 24h (OGLIARI, 1999).

Posteriormente, os frascos foram incubados em BOD a 25°C, com fotoperíodo de 12 horas por aproximadamente 10 dias, até a completa colonização dos grãos de sorgo. Diariamente cada frasco foi agitado para facilitar a colonização de todos os grãos. Os grãos de sorgo colonizados foram espalhados em uma bandeja plástica, contendo folhas de papel toalha

de laboratório, umedecidas com água destilada, e permaneceram incubados em sala de crescimento a 25°C e 12 horas de fotoperíodo por cerca de 96 horas.

Para a obtenção da suspensão de inóculo, os grãos de sorgo colonizados foram retirados da bandeja e colocados em um tubo falcon de 50 mL até se completar 1/3 do volume, com posterior adição de 20 mL de água destilada estéril. Os tubos com os grãos foram agitados em vortex para o desprendimento das estruturas do patógeno, e a suspensão filtrada em gaze, obtendo-se assim uma suspensão de conídios cuja concentração foi ajustada com auxílio de uma câmara de Neubauer, para 1×10^4 conídios/ml, em um experimento, e 1×10^3 conídios/ml para os demais experimentos realizados.

5.3 OBTENÇÃO E PREPARO DO ACIBENZOLAR-S-METÍLICO (ASM) E DOS POLISSACARÍDEOS DE SHIITAKE (*Lentinula edodes*) E BABOSA (*Aloe vera*)

O acibenzolar-S-metílico (ASM) foi obtido através do produto comercial Bion® 500WG (Syngenta) que contém 50% de princípio ativo. No momento da utilização foi realizado sua suspensão em água destilada na dose desejada em ppm.

Já o polissacarídeo vegetal foi obtido de folhas de babosa *Aloe vera*, cedidas pela empresa Naturama Sucos Integrais do Brasil Ltda. As folhas foram lavadas em água corrente e com detergente, para retirada de resíduos grosseiros, e com o auxílio de faca retirou-se a parte externa da folha (casca) e com uma espátula realizou-se a raspagem do parênquima de reserva da babosa.

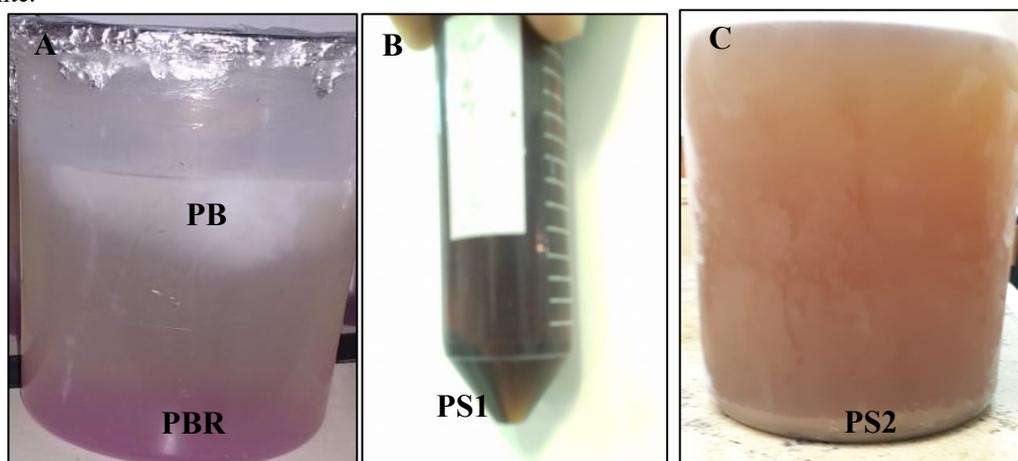
O parênquima de reserva foi processado em um liquidificador industrial, acrescido de etanol 92% na proporção de 1:3 (v/v) e acondicionado a 4 °C por 48h. Posteriormente foi coletada a fase precipitada de coloração branca e aspecto fibroso denominada como polissacarídeo de babosa (PB), e uma fase de coloração rosada e de aspecto viscosos denominada como polissacarídeo de babosa fração rosa (PBR) (Figura 2A). Ambas as frações foram submetidas a secagem a 45 °C até alcançar peso constante, trituradas com o auxílio de um moinho analítico e armazenadas a -20 °C.

Para o uso nos ensaios, os polissacarídeos de babosa foram ressuspensos em água destilada, na dose desejada em mg/mL, submetidos a agitação constante, com a utilização de um Ultra Turrax homogeneizador, por 15 min a 3.600 rpm e incubados em banho maria por 30 min a 100 °C como procedimento padrão no atual estudo. A suspensão de polissacarídeos foi incubada a 8 °C durante 24h antes da aplicação nas plantas (LUIZ, NETO & DI PIERO, 2015).

Para a obtenção do polissacarídeo de shiitake, foram utilizadas estipes residuais cedidas pelo Professor Sérgio Florentino Pascholati (ESALQ/USP). As estipes foram lavadas em água corrente para a retirada de resíduos grosseiros, processadas com água na proporção de 1:10 (m/v) e autoclavadas por 30 min a 120 °C. Depois do resfriamento a temperatura ambiente, a mistura foi filtrada, obtendo assim o extrato bruto aquoso.

O extrato bruto aquoso obtido foi submetido a precipitação com etanol 92% na proporção de 1:1 (v/v), a 4 °C por 48 h, seguido por centrifugação a 11.200 g por 30 min. A fase precipitada foi coletada e se constituiu na fração polissacarídica de shiitake (PS1) (Figura 2B), enquanto o sobrenadante foi novamente submetido à precipitação, utilizando etanol 92% porém na proporção de 1:3 (v/v), mantido a 4 °C por 48h. Após nova centrifugação, realizou-se a segunda coleta da fase precipitada, obtendo-se PS2 (Figura 2C). Ambas as frações polissacarídicas, PS1 e PS2, foram secas a 45 °C até alcançar peso constante. O material seco foi triturado com o auxílio de um moinho analítico e armazenado a -20 °C (CHIHARA et al., 1970; AGUIAR et al., 2018). Para a aplicação nas plantas, os polissacarídeos de shiitake foram ressuspensos em água na dose desejada, em mg/mL, conforme o ensaio.

Figura 2. Polissacarídeos utilizados no estudo. Em (A) polissacarídeo de babosa (PB) e polissacarídeo de babosa fração rosa (PBR), precipitados a partir da adição de etanol 92% no parênquima de reserva, na proporção de 3:1 (v/v); em (B), polissacarídeo de shiitake – fração 1 (PS1) e em (C), polissacarídeo de shiitake – fração 2 (PS2), precipitados a partir da adição de etanol 92% no extrato bruto de shiitake, na proporção de 1:1 (v/v) e 3:1 (v/v), respectivamente.



5.4 PROTEÇÃO DE MILHO CONTRA BIPOLARIS

Os ensaios de proteção de milho foram realizados em delineamento completamente casualizado (DCC) com 6 repetições representadas por vasos de 2L contendo duas plantas.

Os produtos foram aplicados nas plantas, em estágio V4, nos intervalos de tempo de 3 e 5 dias, conforme o desejado, e posteriormente inoculadas com uma suspensão de conídios de

B. maydis, na concentração de 1×10^3 , com exceção do primeiro experimento (cultivar P1630H), onde utilizou-se 1×10^4 conídios/ml. Posteriormente a inoculação as plantas eram submetidas a câmara úmida por 24h. Como testemunha, as plantas foram pulverizadas com água destilada e inoculadas.

A avaliação de severidade foi realizada analisando-se a terceira e quarta folha das plantas com o auxílio da escala diagramática estabelecida por Martinez (2006), modificada por Fernandes et al. (2011), para mancha foliar causada por *B. maydis* em *Panicum maximum* (Figura 3) ao quinto, décimo e décimo-quinto dia após a inoculação (DAI) dependendo do experimento em questão. Com os valores de severidade obtidos das folhas foi calculado a média obtendo um valor para cada unidade amostral.

5.4.1 Efeito do acibenzolar-S-metílico e da fração polissacarídica de babosa

Inicialmente, a fração polissacarídica de babosa (PB) foi pulverizada a 0,5; 1,5 e 3,0 mg/mL, enquanto o acibenzolar-S-metílico (ASM) foi utilizado a 25, 50 e 100 ppm, em experimentos distintos para cada uma das cultivares de milho, com 5 dias de intervalo de tempo entre a aplicação dos produtos e a inoculação com *B. maydis*.

5.4.2 Influência dos modos de preparo de PB

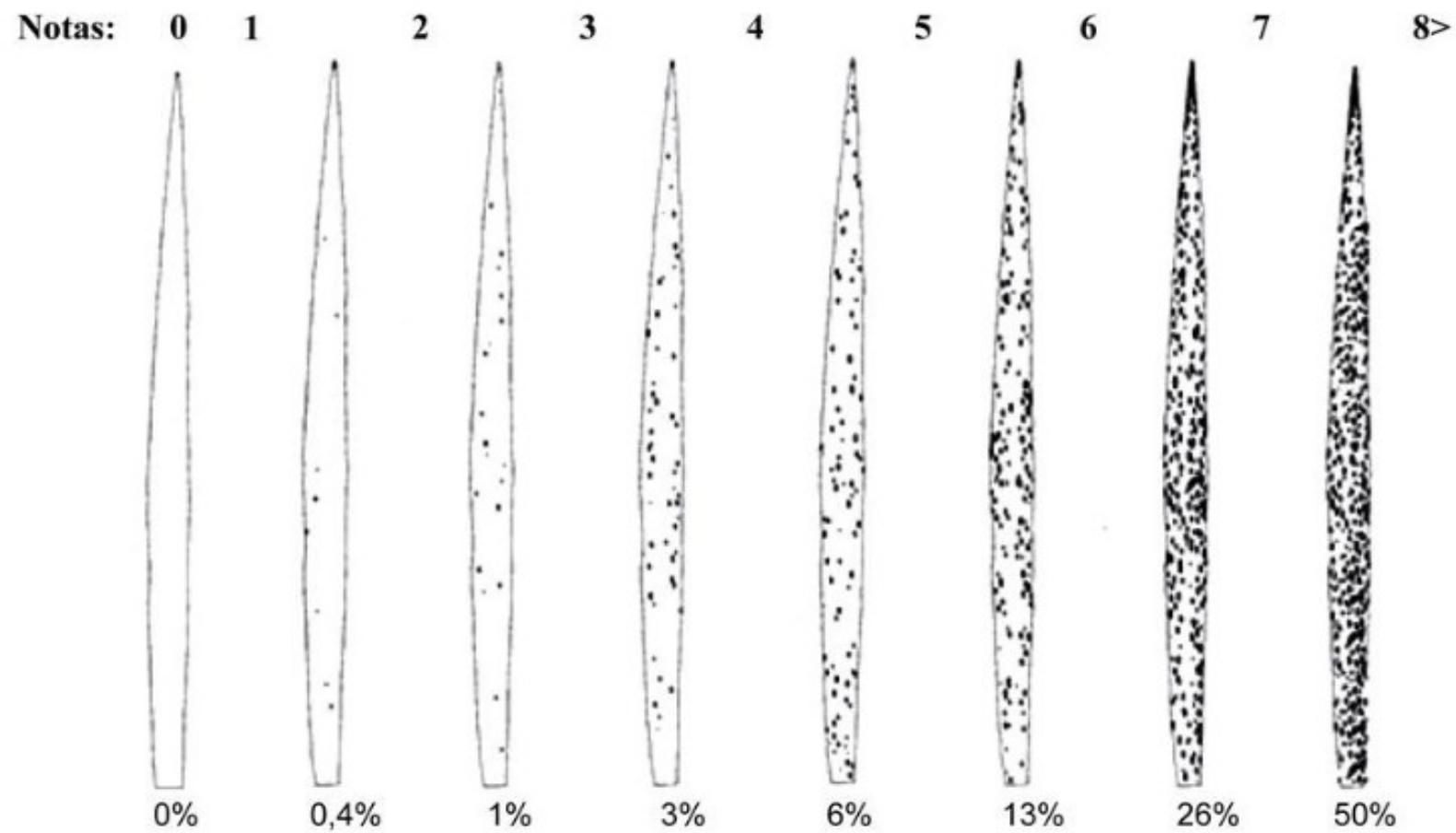
A cultivar BM3063 foi pulverizada com a fração polissacarídica de babosa (PB) aquecida a 50 ou 100 °C por 15 ou 30 min ou autoclavada 120°C por 20 min. As frações foram aplicadas nas plantas em diferentes concentrações (0,75; 1,5 e 3,0 mg/mL), com 3 dias de intervalo de tempo entre a aplicação e a inoculação com *B. maydis*.

Já a cultivar P1630H foi pulverizada com a fração polissacarídica de babosa (PB) e com o polissacarídeo de babosa fração rosa (PBR) a aquecida a 50 ou 100 °C por 15 ou 30 min ou autoclavada 120°C por 20 min. As frações foram aplicadas nas plantas nas concentrações de 1,5 mg/mL, com 5 dias de intervalo de tempo entre a aplicação e a inoculação com *B. maydis*.

5.4.3 Efeitos das frações polissacarídicas de shiitake

As frações polissacarídica de shiitake (PS1 e PS2) foram pulverizadas individualmente em duas doses (a 3,0 e 5,0 mg/mL) e também em mistura (a 3,0 mg/mL) nas duas cultivares de milho, em experimentos distintos, com 3 e 5 dias de intervalo de tempo entre a aplicação das frações e a inoculação com *B. maydis*. O ASM (250ppm) e o PB (3,0 mg/mL) foram aplicados como referências de resultados já obtidos.

Figura 3. Escala diagramática para determinação da severidade da doença causada por *Bipolaris maydis* em milho adaptada de Martinez, 2006 e Fernandes et al., 2011.



5.5 ENSAIO PARA AVALIAÇÃO DE DEFESAS BIOQUÍMICAS

Um experimento foi realizado em delineamento completamente casualizado (DCC) com 5 repetições representadas por vasos de 2L contendo três plantas. Assim as frações PS1 e PS2, na dose de 3.0 mg/mL, foram aplicadas nas duas cultivares de milho, quando estas se encontravam em V4, 3 dias antes da inoculação com o patógeno.

As amostras foram coletadas imediatamente antes da aplicação dos indutores (Dia 0), e também aos 3, 4 e 6 dias após a aplicação (correspondentes a 0, 1 e 3 dias após a inoculação).

Foi considerado como uma amostra a terceira e quarta folha de uma única planta. As amostras foram depositadas em sacos plásticos devidamente identificados e acondicionadas a -20°C até o momento de análise.

5.5.1 Atividade de guaiacol peroxidase

Amostras foliares de 500 mg foram maceradas em nitrogênio líquido e o pó obtido ressuspenso em 6,0 ml de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 5,2) contendo EDTA 1 mM e polivinilpirrolidona 0,5%. As amostras foram centrifugadas a 15.000 g por 30 min a 5 °C e assim coletado o sobrenadante e armazenado a -20°C.

A reação foi realizada em placas de 96 poços adicionando-se 155 µL de tampão fosfato de sódio 50 mM (pH 6,0) contendo guaiacol 1% e H₂O₂ 0,3% mantido em banho maria a 30 °C em 30 µL do extrato proteico diluído em 1:6.

A reação teve a sua absorvância lida a 470 nm, a cada 30 seg por 5 min a 30°C, quantificando o tetraguaiacol formado na reação. Como branco da reação foi utilizada água destilada ao invés do extrato proteico. Os valores da atividade de guaiacol peroxidase foram expressos em densidade óptica (D.O 470nm/mg proteína/min) (HAMMERSCHMIDT, NUCKLES & KUC, 1982).

5.5.2 Atividade de fenilalanina amônia-liase

Para análise da fenilalanina-amônia-liase, as amostras de tecido foliar (500 mg) foram maceradas em nitrogênio líquido e ressuspenso em 6,0 mL de tampão borato de sódio 25 mM (pH 8,8) contendo EDTA 1 mM e polivinilpirrolidona 0,5%. A suspensão obtida foi centrifugada a 15.000 g por 30 min a 4°C e o sobrenadante (extrato proteico) recuperado.

A reação foi realizada em micro tubos de 1,5 mL adicionando-se 25 µL do extrato proteico e 475 µL de tampão borato de sódio 100 mM (pH 8,8) contendo fenilalanina 50 mM,

e assim incubadas a 40°C por 1 h. A reação foi interrompida submetendo as amostras a banho de gelo e adição de 200 µL de HCl 5 N. Posteriormente, foram adicionados 300 µL de água destilada e aliqotados 200 µL da mistura final em placas de 96 poços para a leitura pontual da absorbância a 290 nm. Os resultados foram expressos como mmol de ácido trans-cinâmico formado por mg de proteína por minuto de reação (FALCÓN et al., 2008).

5.5.3 Determinação de proteína total e atividade enzimática

Para poder quantificar a atividade enzimática da guaiacol peroxidase e da fenilalanina-amônia-liase, foi determinada a concentração de proteínas totais de cada amostra pelo método de Bradford (1976).

O reagente foi preparado pela diluição de 125 mg do *Coomassie Brilliant Blue* em 63 mL de etanol a 95% e 125 mL de ácido fosfórico 85% e completado com água destilada para o volume final de 500 mL. Para a reação, realizada em placas de 96 poços, utilizaram-se 150 µL de extrato proteico diluído (1:4) e 30 µL do reagente Bradford. As amostras foram incubadas no escuro por 15 min e a leitura da absorbância realizada a 595 nm.

Posteriormente, foi realizada a conversão dos valores de absorbância de cada amostra para mg de proteína, através de curva padrão construída utilizando-se de albumina de soro bovino.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados de severidade e de atividade enzimática foram analisados através do *software* estatístico Graph Pad Prisma 8.4.3 com a realização da análise descritiva dos dados e também os testes de Shapiro-Wilk e Bartlett para a verificação da normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Cumpridos os critérios, os dados foram submetidos à análise de variância (F-teste, $P < 0,05$) e separação das médias (Dunnett, $P < 0,05$ e $0,001$).

6 RESULTADOS

6.1 PROTEÇÃO DE PLANTAS DE MILHO

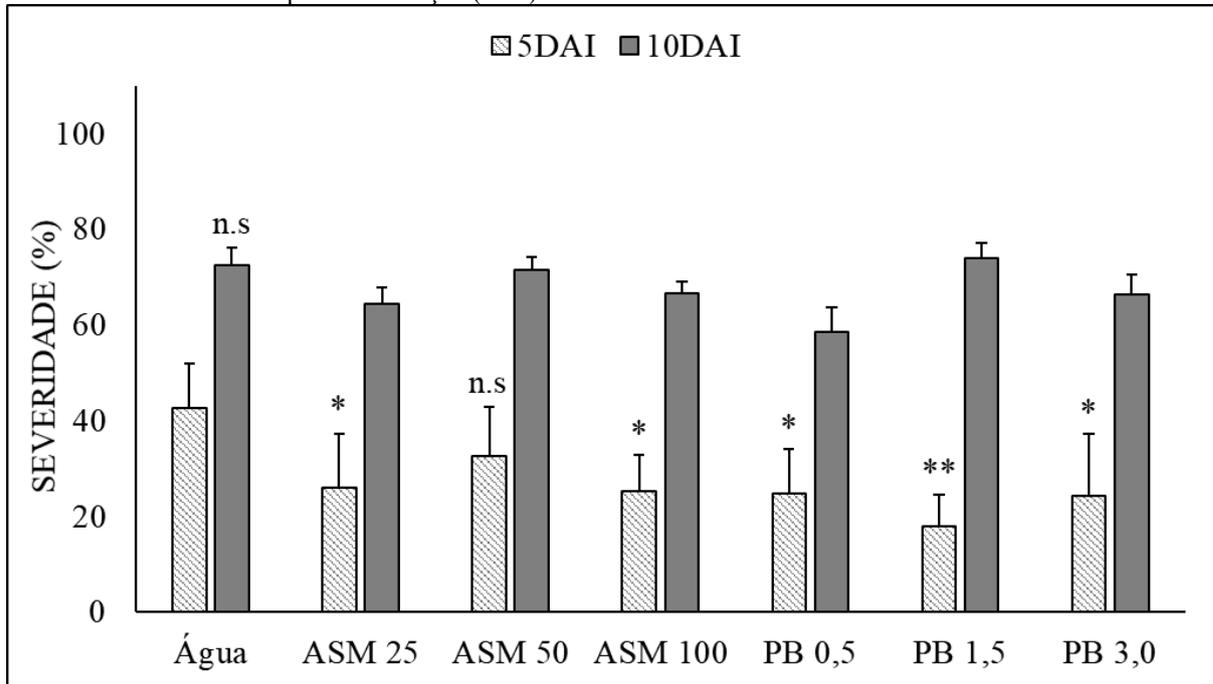
6.1.1 Efeito do acibenzolar-S-metílico e da fração polissacarídica de babosa

Com a finalidade de se explorar o potencial indutor do acibenzolar-s-metílico (ASM) e do polissacarídeo de babosa (PB), inicialmente diferentes doses de ASM (25, 50 e 100 ppm) e de PB (0,5, 1,5 e 3 mg/mL) foram pulverizadas em ambas as cultivares de milho (P1630H e BM3063) com intervalo de tempo de 5 dias entre a aplicação e a inoculação das plantas com *B. maydis*. Nesses experimentos a suspensão de PB foi preparada a partir do aquecimento a 100°C por 30 min, procedimento adotado como padrão no atual estudo.

No híbrido BM3063, o ASM na dose de 25 e 100 ppm assim como todas as doses de PB reduziram significativamente a severidade da doença (44%) na primeira avaliação, aos 5 dias após a inoculação (DAI), destacando-se PB a 1,5 mg/mL com redução de 58% em relação à testemunha. Contudo, na avaliação posterior (10DAI), não houve reduções expressivas da severidade em relação à testemunha (Figura 4).

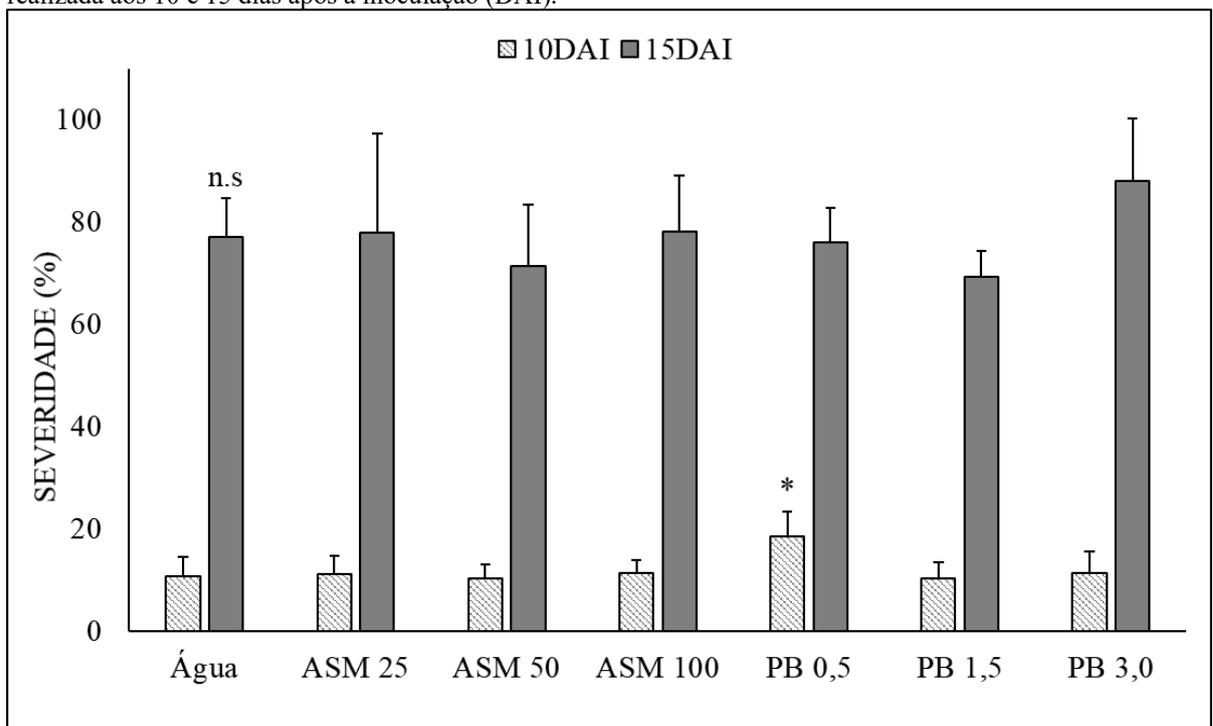
Outro ensaio foi realizado aos moldes do primeiro, porém utilizando-se o material P1630H, sob uma pressão de inóculo menor (10^3 esporos/mL). Em ambos os momentos de avaliação não houve redução da severidade, entretanto o PB a 0,5 mg/mL ocasionou o aumento significativo da severidade, no primeiro momento de avaliação, em relação a testemunha (Figura 5).

Figura 4. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar BM3063 pulverizadas com água destilada, acibenzolar-s-metílico (ASM) a 25, 50 e 100 ppm, ou polissacarídeo de babosa (PB) a 0,5; 1,5 e 3,0 mg/mL 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^4 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI).



Médias seguidas por um ou dois asteriscos (*) apresentam diferença significativa em relação a testemunha, dentro do mesmo momento de avaliação, pelo teste de Dunnett aos níveis de significância de 0,05 e 0,001 respectivamente. n.s.: não significativo.

Figura 5. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água destilada, acibenzolar-s-metílico (ASM) a 25, 50 e 100 ppm, ou polissacarídeo de babosa (PB) a 0,5; 1,5 e 3,0 mg/mL 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 10 e 15 dias após a inoculação (DAI).



Médias seguidas por asteriscos (*) apresentam diferença significativa em relação a testemunha, dentro do mesmo momento de avaliação, pelo teste de Dunnett ao nível de significância 0,05. n.s.: não significativo.

6.1.2 Influência dos modos de preparo de PB

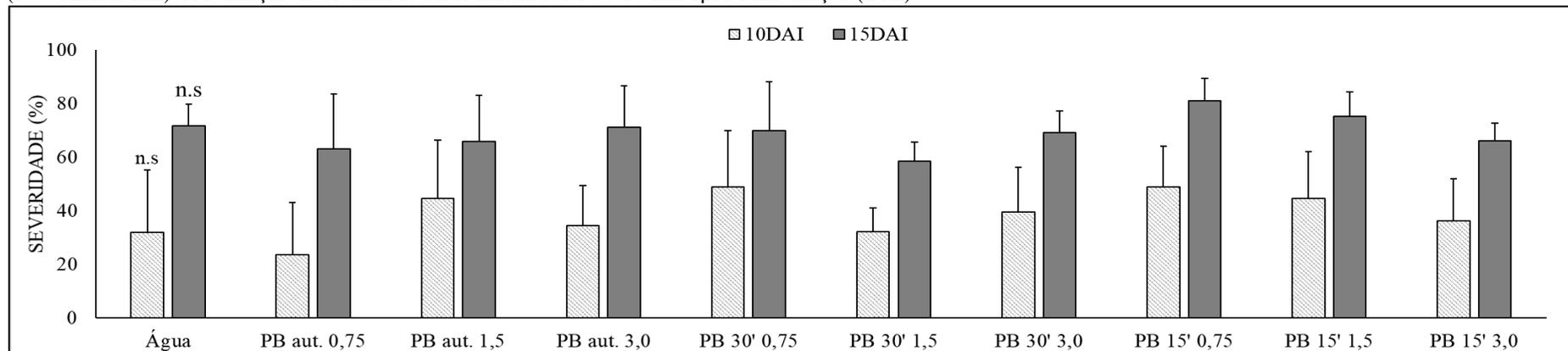
Nos dois experimentos seguintes, avaliou-se a influência dos modos de preparo do PB sobre a severidade da mancha de bipolaris. Na cultivar BM3063, PB (aplicado a 0,75; 1,5 e 3,0 mg/mL aos 3 dias antes da inoculação) não reduziu a severidade da doença nos dois momentos de avaliação, independentemente do tempo e temperatura de aquecimento do polissacarídeo durante seu preparo (Figura 6). Algo similar ocorreu na cultivar P1630H utilizando PB e PBR, aplicados 5 dias antes da inoculação das plantas, ou seja, os polissacarídeos aquecidos a 50 ou 100°C durante 15 a 30 min, e mesmo sob autoclavagem (120°C por 20 min), não reduziram a doença, quando utilizados na dose de 1,5 mg/mL (Figura 7).

6.1.3 Efeito das frações polissacarídicas de shiitake

Com a finalidade de se explorar o potencial indutor das frações polissacarídicas de shiitake (PS1 e PS2), diferentes doses (3 e 5 mg/mL) foram pulverizadas em ambas as cultivares de milho (P1630H e BM3063) com intervalos de tempo de 3 e 5 dias entre a aplicação e a inoculação das plantas com *B. maydis*.

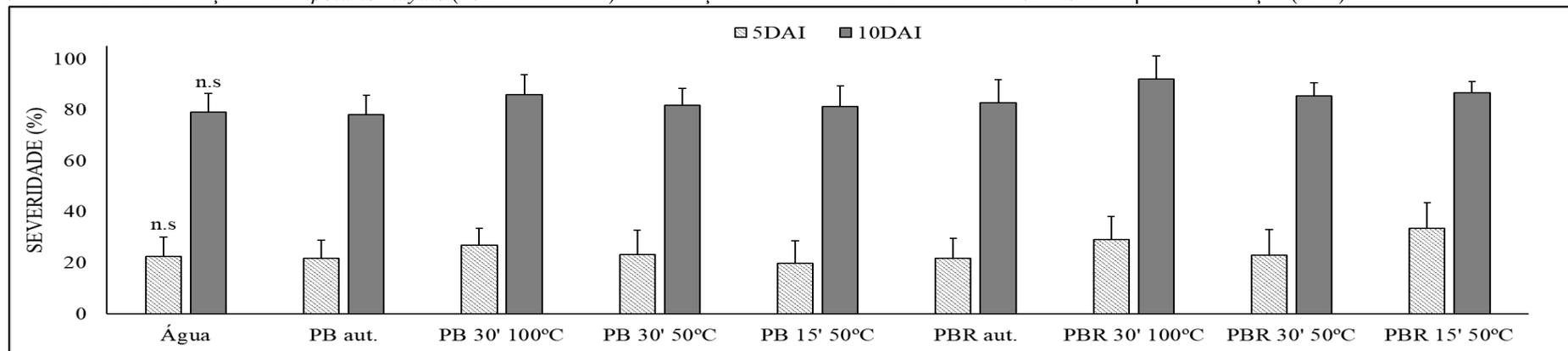
Na cultivar P1630H, somente PS1 (aplicado a 3 e 5 mg/mL aos 3 dias antes da inoculação) assim como sua aplicação em mistura a PS2 (a 3 mg/mL) reduziram a severidade da doença (61%) no segundo momento de avaliação (Figura 8). Já para a cultivar BM3063 ambas as frações (aplicadas a 3 e 5 mg/mL aos 3 ou 5 dias antes da inoculação) reduziram a severidade da doença nos dois momentos de avaliação (66%). Por outro lado, a aplicação conjunta de PS1 e PS2 (a 3 mg/mL) no segundo momento de avaliação não apresentou redução da doença (Figura 9).

Figura 6. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar BM3063 pulverizadas com água destilada ou fração polissacarídica de babosa (PB a 0,75; 1,5 e 3,0 mg/mL) autoclavada (aut.) ou submetida a diferentes tempos de aquecimento (15 e 30 min.) na temperatura fixa de 50°, aos 3 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 10 e 15 dias após a inoculação (DAI).



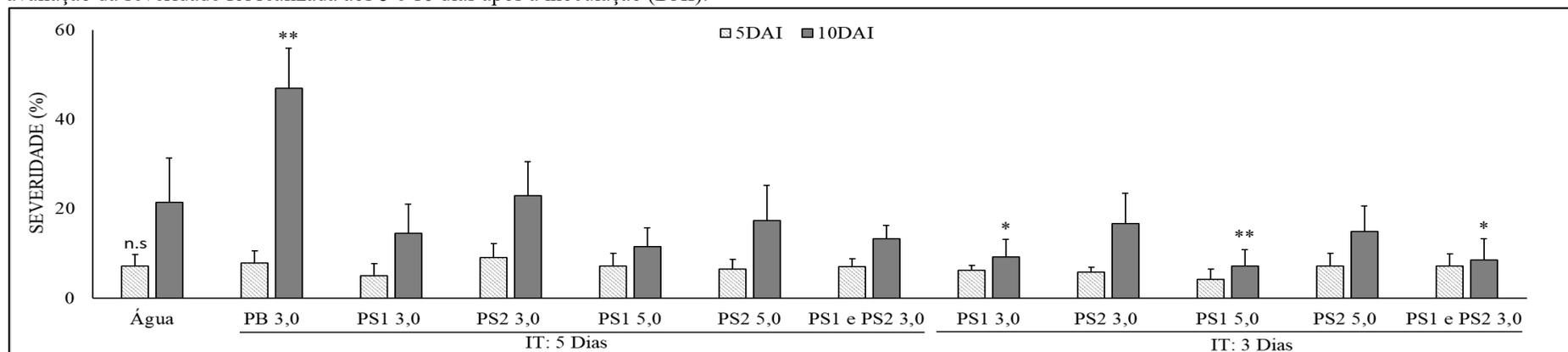
n.s.: não significativo.

Figura 7. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água destilada, polissacarídeo de babosa (PB) ou polissacarídeo de babosa fração rosa (PBR) a 1,5 mg/mL. As frações foram autoclavada (aut.) ou submetidas a diferentes tempos (15 e 30 min.) e temperaturas (50 e 100°C) de aquecimento e pulverizadas 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI).



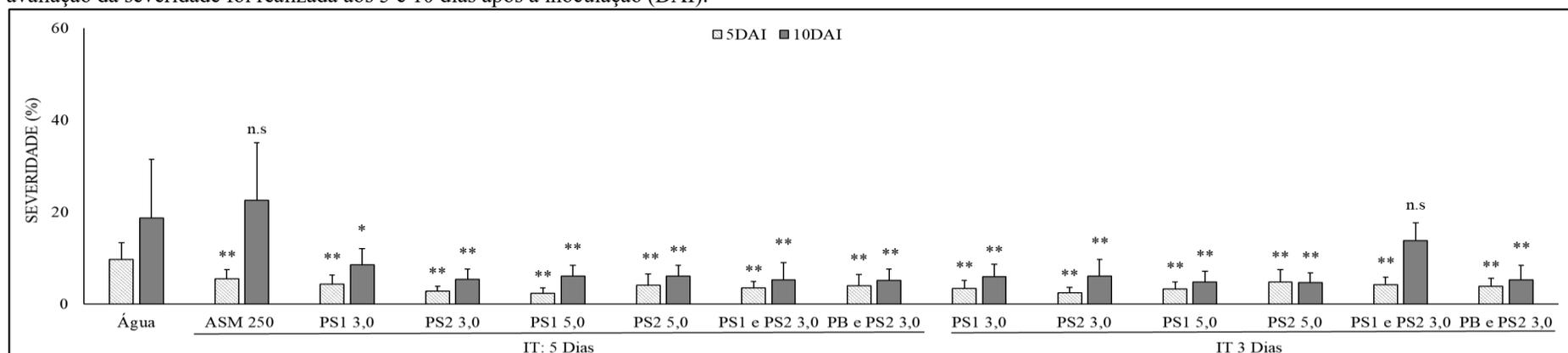
n.s.: não significativo.

Figura 8. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar P1630H pulverizadas com água destilada, polissacarídeo de babosa (PB) a 3,0 mg/mL, ou com os polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2) a 3,0 e 5,0 mg/mL, em intervalos de tempo (IT) de 3 ou 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI).



Médias seguidas por um ou dois asteriscos (*) apresentam diferença significativa em relação a testemunha, dentro do mesmo momento de avaliação, pelo teste de Dunnett aos níveis de significância de 0,05 e 0,001 respectivamente. n.s: não significativo.

Figura 9. Severidade de *Bipolaris maydis* em plantas de milho da cultivar BM3063 pulverizadas com água destilada, acibenzolar-s-metílico (ASM) a 250 ppm, ou com os polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2) a 3,0 e 5,0 mg/mL, em intervalos de tempo (IT) de 3 ou 5 dias antes da inoculação com *Bipolaris maydis* (10^3 conídios/mL). A avaliação da severidade foi realizada aos 5 e 10 dias após a inoculação (DAI).



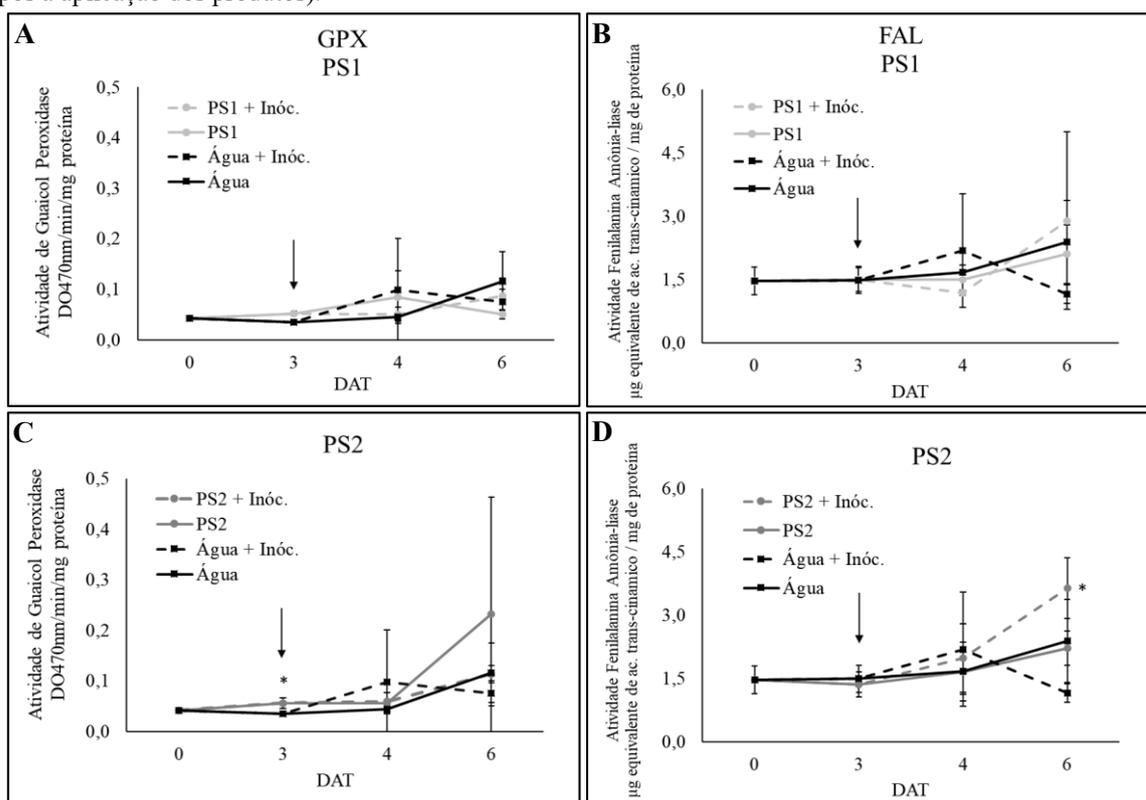
Médias seguidas por um ou dois asteriscos (*) apresentam diferença significativa em relação a testemunha, dentro do mesmo momento de avaliação, pelo teste de Dunnett aos níveis de significância de 0,05 e 0,001 respectivamente. n.s: não significativo.

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para o material P1630H, a fração PS1 não promoveu alteração na atividade enzimática da GPX e FAL (Figura 10A, B). Contudo a fração PS2 promoveu acréscimo significativo (60%) na atividade enzimática de GPX 3 dias após sua aplicação (Figura 10C). Assim como o aumento significativo (200%) da atividade enzimática da FAL três dias após o confronto com *B. maydis* (Figura 10D).

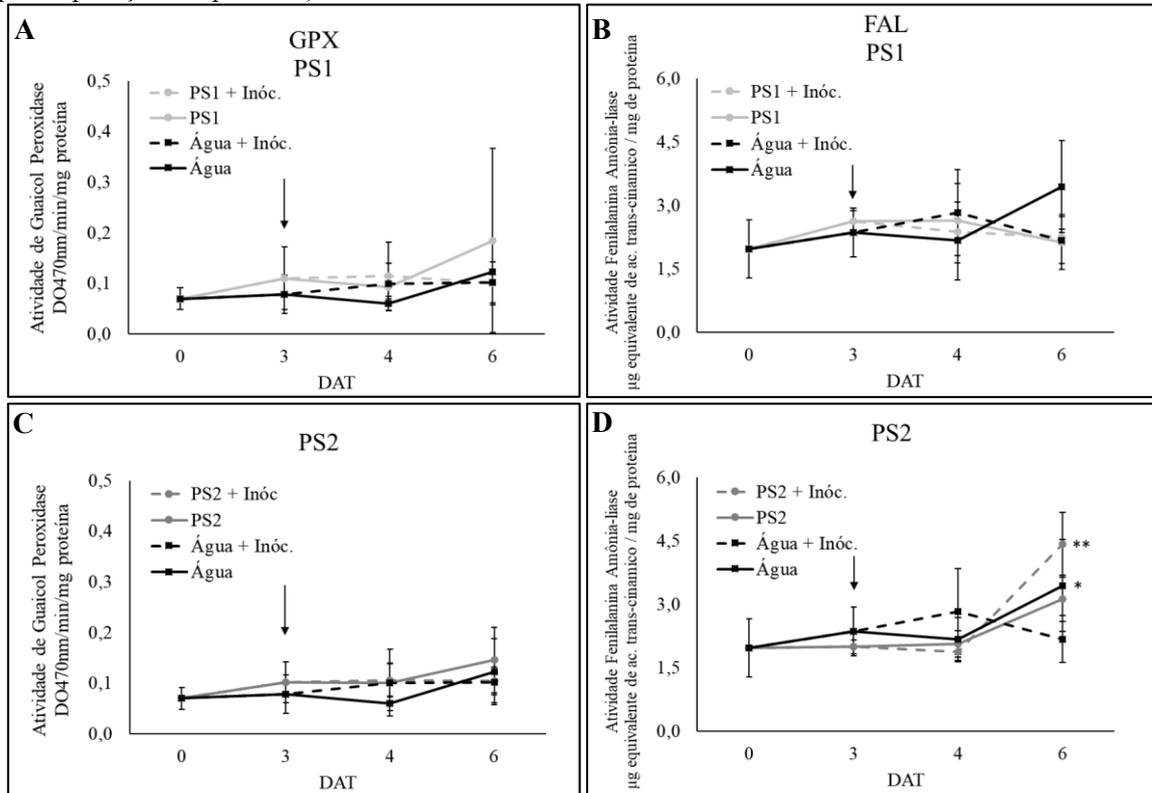
No material BM3063 também não houve alterações na atividade enzimática da GPX e FAL, quando aplicado a fração PS1 (Figura 11A, B). Já a fração PS2, nesse material, não ativou a GPX (Figura 11C) mas promoveu o aumento significativo (100%) na atividade enzimática da FAL também aos 3 dias após o confronto com *B. maydis* (Figura 11D).

Figura 10. Média da atividade enzimática de guaiacol peroxidase (A e C) e fenilalanina amônia-liase (B e D), em diferentes momentos após o tratamento com as diferentes frações de polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2), na dose de 3,0 mg/mL, aplicadas na cultivar P1630H. A seta indica o momento da inoculação do patógeno (3 dias após a aplicação dos produtos).



PS1 + Inóc. = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 1 e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias após; PS1 = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 1; PS2 + Inóc. = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 2 e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias após; PS2 = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 2; Água + Inóc. = Plantas pulverizadas com água destilada e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias após. Água = Plantas pulverizadas com água destilada. Médias seguidas por asteriscos (*) apresentam diferença significativa em relação a testemunha não inoculada no 3 DAT, e a testemunha inoculada no 6 DAT pelo teste de Dunnett ao nível de significância de 0,05.

Figura 11. Média da atividade enzimática de guaiacol peroxidase (A e C) e fenilalanina amônia-liase (B e D), em diferentes momentos após o tratamento com as diferentes frações de polissacarídeos de shiitake (PS1 e PS2), na dose de 3,0 mg/mL, aplicadas na cultivar BM3063. A seta indica o momento da inoculação do patógeno (3 dias após a aplicação dos produtos).



PS1 + Inóc. = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 1 e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias após; PS1 = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 1; PS2 + Inóc. = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 2 e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias após; PS2 = Plantas pulverizadas com o polissacarídeo de shiitake – fração 2; Água + Inóc. = Plantas pulverizadas com água destilada e inoculadas com *B. maydis*, 3 dias após. Água = Plantas pulverizadas com água destilada. Médias seguidas por um ou dois asteriscos (*) apresentam diferença significativa em relação a testemunha inoculada pelo teste de Dunnett aos níveis de significância de 0,05 e 0,001 respectivamente.

7 DISCUSSÃO

A ativação dos mecanismos de defesa das plantas por meio de elicitores exógenos, de natureza biótica ou abiótica, vem sendo amplamente estudada como manejo alternativo por seus impactos ambientais reduzidos. A resistência sistêmica adquirida (SAR) é um dos fenômenos de indução de resistência já conhecidos em plantas tendo o ácido salicílico (AS) um papel fundamental na sinalização, assim como na ativação local e sistêmica de defesa e possivelmente na regulação da morte celular (STEINER & SCHÖNBECK, 1995; DEMPSEY, SHAH & KLESSIG, 1999).

O acibenzolar-S-metílico (ASM) é um análogo sintético ao AS, influenciando diretamente nesta via de sinalização de defesa, promovendo o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), reação de hipersensibilidade (HR) e a expressão de proteínas PR nas plantas tratadas (ZULUAGA, VEGA-ARREGUÍN & FRY, 2013). Atualmente tal princípio está presente na composição de produtos comerciais como o Bion[®], registrado para uso contra 29 doenças, duas delas envolvendo monocotiledôneas: o míldio da cebola, causado *Peronospora destructor* e o oídio no trigo, cujo o agente causal é o fungo *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*.

Especificamente em milho, Morris et al. (1998) relataram a indução de resistência a míldio (*Peronosclerospora sorghi*) quando sementes foram previamente tratadas com ASM. Aplicado sob condições de campo, ASM promoveu a redução da severidade de doenças como a mancha branca (*P. ananatis*) e mancha de turcicum (*E. turcicum*) mas não reduziu a severidade da cercosporiose (*Cercospora* spp.) (NEUMANN et al., 2016; BARROS, 2011). No atual estudo, contra *B. maydis* em milho, ASM também não foi eficiente,

A forma de colonização dos patógenos influencia a via de transdução de sinal ativada, conforme demonstrado em *Arabidopsis*, com patógenos biotróficos induzindo respostas de defesa através da via de sinalização de ácido salicílico e patógenos necrotróficos através da via do ácido jasmônico e etileno (HALIM et al., 2006). Em milho, esse tipo de resposta também parece acontecer já que a aplicação de ASM, produto relacionado à via do ácido salicílico, não foi eficiente para conter *B. maydis*, um fungo necrotrófico, corroborando com esses dados, Ziemann et al. (2018) observaram o aumento da suscetibilidade a patógenos necrotróficos (*Botrytis cinerea*) em milho após a aplicação de um peptídeo apoplástico (Zip1) extraído de folhas previamente tratadas com AS.

A fração polissacarídica de babosa contém predominantemente acemanana e pectina, os quais poderiam funcionar como elicitores similares aos conhecidos como DAMPs (padrões moleculares associados a danos), os quais são gerados pela ação de enzimas de fitopatógenos

sobre a parede celular vegetal. Oligogalacturonídeos foram reportados como capazes de ativar respostas de defesa como a produção de ROS, acúmulo de fitoalexinas e de proteínas de defesa (MINJARES-FUENTES et al., 2018; HOU et al., 2019).

Os polissacarídeos de babosa recentemente demonstraram eficiência na indução de resistência em patossistemas bacterianos como, *Xanthomonas gardneri* – tomate e *Xanthomonas fragariae* – morangueiro, ativando enzimas como peroxidase, superóxido dismutase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase somado ao acúmulo de peróxido de hidrogênio e incremento no teor de flavonoides (LUIZ, NETO & DI PIERO, 2015; LUIZ et al., 2017). Foi observada uma influência dos modos de preparo desses polissacarídeos sobre o controle da bacteriose em tomateiro, onde o aquecimento da fração polissacarídica a 100°C por 30 min promoveu maior nível de redução na severidade da doença em relação ao polissacarídeo não aquecido, sugerindo que ocorreu a quebra em mono e oligossacarídeos com maior atividade elicitora (LUIZ et al., 2012). Por conta desse resultado, adotou-se o aquecimento de PB a 100°C por 30 min como procedimento padrão no atual estudo.

Os resultados de PB contra bacterioses contrastam com os obtidos para o fungo *B. maydis*, pois este polissacarídeo não foi eficiente na redução da severidade da doença, independente do modo como havia sido previamente preparado. A acemanana apresenta características como baixa solubilidade e hidrofobicidade (MOREIRA et al., 2008; CHOKBORIBAL et al., 2015), dificultando sua travessia pela parede celular, a qual é composta de 60% de água (VORWERK, SOMERVILLE & SOMERVILLE, 2004; PETTOLINO et al., 2012). Dessa maneira esse polissacarídeo pode não estar chegando até as proteínas de percepção presentes na membrana celular, e acabar permanecendo na superfície foliar servindo como fonte de açúcar para *B. maydis*, patógeno necrotrófico, o que explicaria o aumento na severidade da doença observado em um dos experimentos.

Por outro lado, as frações polissacarídicas de shiitake utilizada no presente trabalho (PS1 e PS2) foram efetivas na redução da severidade da mancha de bipolaris e na ativação de enzimas de defesa em milho. Chihara et al. (1970) caracterizaram como lentinana (glucana de cadeia longa) uma fração de shiitake precipitada com etanol na proporção de 3:1, sendo sugerido aqui algo que poderia ser próximo a composição do PS1. Já a fração PS2 poderia representar glucanas de menor tamanho molecular pois foi precipitada a uma proporção de etanol maior do que a primeira fração (XU et al., 2014).

Balmer et al. (2013) resumiram os casos de sucesso de indução de resistência em monocotiledôneas relatando até então a existência de quatro proteínas de percepção em arroz (FLS2, CEBiP, CERK1 e Xa21) capazes de reconhecerem padrões microbianos como flagelina,

quitina e aminoácidos. Para o milho há somente a hipótese de uma proteína receptora possivelmente relacionada a compostos voláteis liberados em processos de herbivoria.

Assim, recentemente, Wanke et al. (2020) elucidaram a diferença da percepção de β -1,3 glucanas de cadeias longas e curtas entre gramíneas e dicotiledôneas. As gramíneas reconheceram glucanas de cadeias longas e curtas, enquanto dicotiledôneas somente as de cadeias longas. Isso pode estar relacionado com a diferença na composição da parede celular entre gramíneas e dicotiledôneas, onde plantas como cevada, arroz, sorgo e trigo apresentam ligações com glucanas β -1,3 de modo constitutivo em suas paredes.

O PS1 no presente trabalho foi efetivo na redução da severidade de *B. maydis* em ambas as cultivares de milho, mas sem promover aumentos nas atividades de enzimas de defesa nos momentos avaliados (até 72h após a inoculação), o que poderia ser explicado por se tratar de um polímero de maior peso molecular. A degradação de PS1 na superfície foliar geraria um efeito a longo prazo através da formação de oligossacarídeos que poderiam ser reconhecidos como elicitores.

A possível diferença nos tamanhos das frações também explicaria o fato da fração PS2 ter sido efetiva na ativação da GPX para o P1630H e FAL em ambos os materiais, pois seu menor tamanho facilitaria a passagem pela parede celular, ligação aos receptores, e ativação de defesa a curto prazo. O aumento da atividade de FAL (200% - 100%) nas cultivares tratadas com PS2, 72h após o desafio com o patógeno, pode estar relacionado com o aumento de compostos antioxidantes e de precursores da lignina como o álcool p-cumarílico, álcool sinapílico e álcool coniferílico. Esses precursores poderiam contribuir com a regulação de ROS para níveis que não resultem em HR e para o fortalecimento da parede celular (LATTANZIO et al., 2006; PANDEY et al., 2017).

Dessa forma, dos elicitores avaliados, o acibenzolar-S-metílico e a fração polissacarídica da babosa não apresentaram consistência na redução da mancha de *bipolaris* enquanto que os polissacarídeos de shiitake foram efetivos para as duas cultivares de milho, com a fração de menor tamanho ativando enzimas de defesa (GPX e FAL) nos primeiros dias após a inoculação das plantas.

Os resultados obtidos no presente estudo podem também apresentar potencial de uso junto a cultivares de milho crioulo que por possuírem maior variabilidade genética podem ter um arsenal de genes de defesa maior a ser potencialmente ativado. Contribuindo além disso com a utilização de substâncias menos nocivas ao meio ambiente, a saúde e alimentação humana, algo fundamental para se garantir a segurança alimentar dentro da propriedade de agricultura familiar.

8 CONCLUSÃO

O polissacarídeo de shiitake demonstra potencial de uso no manejo da mancha de *B. maydis* no milho para ambas as cultivares promovendo a ativação das enzimas guaiacol peroxidase e fenilalanina amônia-liase, relacionadas à defesa das plantas.

REFERÊNCIAS

- ADAPAR. **Bula Bion[®] 500 WG.** Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Outros/BION500WG061217.pdf>> Acesso em: 01 de set. de 2018.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários.** Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 02 ago. 2020.
- AGUIAR, T. et al. Residual polysaccharides from fungi reduce the bacterial spot in tomato plants. Campinas **Bragantia**. p.14, 2018.
- ALCORN, J. L. The taxonomy of " Helminthosporium" species. **Annual Review of Phytopathology**, v. 26, n. 1, p. 37-56, 1988.
- ALI, F. et al. Genetic analysis of maturity and morphological traits under maydis leaf blight (MLB) epiphytotics in maize (*Zea mays* L.). **J. Agric. Biol. Sci**, v. 6, p. 13-1, 2011.
- ALVIM, K. R. T. et al. Quantificação da área foliar e efeito da desfolha em componentes de produção de milho. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1017-1022, 2010.
- ANPC. **Cogumelos.** Nov. 2013. Disponível em: <<https://www.anpccogumelos.org/cogumelos>> Acesso em: 04 de ago. de 2018.
- ANVISA. **Índice monográfico A38.** Fev. 2018. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/A38%2B%25E2%2580%2593%2BAcibenzolar-S-Met%25C3%25ADlico.pdf/580584f6-5287-4b78-baee-722477c27d94>> Acesso em: 04 de ago. de 2018.
- ARAUJO, L. et al. Induction of the phenylpropanoid pathway by acibenzolar-s-methyl and potassium phosphite increases mango resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. **Plant Disease**, v. 99, n. 4, p. 447-459, 2015.
- ARAÚJO, P. M.; NASS, L. L. Caracterização e avaliação de populações de milho crioulo. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 589-593, 2002.
- BACH, D. B.; LOPES, M. A. Estudo da viabilidade econômica do cultivo da babosa (*Aloe vera* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1136-1144, 2007.
- BALBI-PEÑA, M. I. et al., Controle de *Alternaria solani* em tomateiro por extratos de *Curcuma longa* e curcumina-II. Avaliação in vivo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 4, p. 401-404, 2006.
- BALMER, D.; PLANCHAMP, C.; MAUCH-MANI, B. On the move: induced resistance in monocots. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1249-1261, 2013.
- BARBEDO, J. G. A. A review on the main challenges in automatic plant disease identification based on visible range images. **Biosystems engineering**, v. 144, p. 52-60, 2016.

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

BENELLI, A. I. H; DENARDIN, N. D.; FORCELINI, C. A. Ação do acibenzolar-S-metil aplicado em tubérculos e plantas de batata contra canela preta, incitada por *Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum* atípica. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 3, 2004.

BOAVA, L. P. et al. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, p. 124-128, 2010.

BONO, J. et al. Modo de aplicação de fertilizantes nitrogenados na qualidade fisiológica de sementes de milho. **Revista Agrarian**, v.1, n.2, p.91 – 102, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BUONAURIO, R. et al. Induction of systemic acquired resistance in pepper plants by acibenzolar-S-methyl against bacterial spot disease. **European Journal of Plant Pathology**, v. 108, n. 1, p. 41-49, 2002.

CHIHARA, G. et al. Fractionation and purification of the polysaccharides with marked antitumor activity, especially lentinan, from *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (an edible mushroom). **Cancer research**, v. 30, n. 11, p. 2776-2781, 1970.

CHOKBORIBAL, J. et al. Deacetylation affects the physical properties and bioactivity of acemannan, an extracted polysaccharide from *Aloe vera*. **Carbohydrate polymers**, v. 133, p. 556-566, 2015.

COOPER, R. M. MAMPs-Induced Defences and How Pathogens Overcome it. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA: NOVOS CONCEITOS E APLICAÇÕES, 09, 2010, Lavras. **Anais eletrônicos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/nefit/livros/livro-2010.pdf>> Acesso em: 22 de jun. 2020.

COSTA, M. G. et al. Desempenho produtivo de vacas leiteiras alimentadas com diferentes proporções de cana-de-açúcar e concentrado ou silagem de milho na dieta. **Revista brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2437-2445, 2005.

COSTA, R.V. et al. Incidence of *Colletotrichum graminicola* in stalk from maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, v.36, n.2, p.122 – 128, 2010.

COTA, L. V. et al. Helminthosporiose Causada por *Exserohilum turcicum* na Cultura do Milho. **Circular Técnica**, v. 195, p. 8, 2013.

CRUZ, J. C. et al. **Produção de milho orgânico na agricultura familiar**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006.

DA COSTA, R. V. et al. Reação de híbridos comerciais de milho à mancha-de-bipolaris em diferentes épocas de semeadura. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2018.

DA COSTA, R. V.; DA SILVA, D. D.; COTA, L. V.. Mancha-de-Bipolaris-do-Milho. **Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 2014.

DA SILVA, L. H. C. P. et al. Controle químico de doenças foliares no milho safrinha. In: X SEMINÁRIO NACIONAL DE MILHO SAFRINHA, 2009. Rio Verde. **Anais eletrônicos**. Rio Verde. Disponível em: <www.abms.org.br/eventos_antteriores/milhosufrinha2009/palestras/palestra03.pdf> Acesso em: 23 de jun. 2020.

DAGNE, E. et al. Chemistry of Aloe species. **Current Organic Chemistry**, v. 4, n. 10, p. 1055-1078, 2000.

DANISH, P. et al. Antifungal and antibacterial activity of aloe vera plant extract. **Biological and Clinical Sciences Research Journal**, v. 2020, p. e003, 2020.

DANNER, M. A. et al. Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 7, p. 793-799, 2008.

DANTAS, M. B. et al. Obtenção de Biodiesel através da Transesterificação do Óleo de Milho: Conversão em Ésteres Etílicos e Caracterização Físico-Química. In: **I Congresso da Rede brasileira de tecnologia de Biodiesel**, Brasília. 2006. p. 236-240.

DE LIMA, B. C. et al. Diversidade genética em acessos de milho crioulo. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 82712-82726, 2020.

DE RODRIGUEZ, D. J. et al. Antifungal activity in vitro of Aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 1, p. 81-87, 2005.

DEMPSEY, D. M. A.; SHAH, J.; KLESSIG, D. F. Salicylic acid and disease resistance in plants. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 4, p. 547-575, 1999.

DI PIERO, R. M.; WULFF, N. A.; PASCHOLATI, S. F. Partial purification of elicitors from *Lentinula edodes* basidiocarps protecting cucumber seedlings against *Colletotrichum lagenarium*. **Brazilian journal of Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 175-180, 2006

EGEL, D. S. et al. Acibenzolar-S-methyl is associated with yield reduction when used for managing bacterial wilt (*Erwinia tracheiphila*) in cantaloupe. **Crop Protection**, v. 109, p. 136-141, 2018.

EL-DASH, A.; CABRAL, L. C.; GERMANI, R. Tecnologia de farinhas mistas. **Brasília: Embrapa**, v. 6, 1994.

EPAGRI/CEPA, Empresa de Pesquisa Agropecuária. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2017-2018. 2018.

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

FERNANDES, C. D. et al. Reação de híbridos de *Panicum maximum* à mancha das folhas em condições de infecção natural. In: **International Symposium on Forage Breeding**. 2011. p. 59-61.

FERRARI, D. L. **Agricultura familiar, trabalho e desenvolvimento no Oeste de Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 190. 2003.

FERREIRA NETTO, R. G. **Resíduo de colheita de shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) na alimentação de frangos de corte e poedeiras comerciais**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Botucatu, p. 190. 2018.

FIESP. **Safra Mundial de Milho 2019/20 – 9º Levantamento do USDA**. 2020a. Disponível em: < <https://sitefiespstorage.blob.core.windows.net/uploads/2020/01/file-20200115140446-boletimmilhojaneiro2020.pdf> >. Acesso em: 1 jun. 2020.

FIESP. **Safra Mundial de Milho 2020/21 – 1º Levantamento do USDA**. 2020b. Disponível em: < <https://www.fiesp.com.br/indices-pesquisas-e-publicacoes/safra-mundial-de-milho-2/attachment/file-20200514191213-boletimmilhomaio2020/> >. Acesso em: 1 jun. 2020.

FILHO, D. F., **Manual da Cultura do Milho**. Jaboticabal: Funep, 2007.

FILHO, I. A. P.; BORGHI, E. Sementes de milho: nova safra, novas cultivares e continua a dominância dos transgênicos. **Embrapa Milho e Sorgo-Documentos (INFOTECA-E)**, 2020.

FILHO, J. A. W. et al., **Manejo Fitossanitário da Cultura do Milho**. Florianópolis: Epagri, 2012.

FIORI-TUTIDA, A.C.G. et al. Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.33, n.3, p.287- 289, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT – Forestry 2009. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx#ancor>> Acesso em 26 jun. 2018.

GODARD, S. et al. Induction of defence mechanisms in grapevine leaves by emodin-and anthraquinone-rich plant extracts and their conferred resistance to downy mildew. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 827-837, 2009.

GOODMAN, R. N. et al. **The biochemistry and physiology of plant disease**. University of Missouri Press, 1986.

HALIM, V. A. et al. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. **Plant Biology**, v. 8, n. 3, p. 307-313, 2006.

HAMMERSCHMIDT, R. Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens?. **Physiological and Molecular Plant Pathology** v. 55, p. 77-84 ,1999.

HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. Induced resistance to disease in plants. **Vol. (Eds, Hammerschmidt, R. and Kuc, J.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands**, p. 169-175, 1995.

HAMMERSCHMIDT, R.; MÉTRAUX, J. P.; VAN LOON, L. C. Inducing resistance: a summary of papers presented at the First International Symposium on Induced Resistance to Plant Diseases, Corfu, May 2000. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, p. 1-6, 2000.

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

HARISH, S. et al. Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. **BioControl**, v. 53, n. 3, p. 555, 2008.

HATVANI, N. Antibacterial effect of the culture fluid of *lentinus edodes* mycelium grown in submerged liquid culture. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2001, vol. 17, no.1, p. 71-74.

HOU, S. et al. Damage-associated molecular pattern-triggered immunity in plants. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 646, 2019.

ISHIHARA, A. et al. Induction of defense responses by extracts of spent mushroom substrates in rice. **Journal of pesticide science**, p. D18-063, 2019.

KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Volume 2 Doenças das Plantas Cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2005.

KUHN, O. J. et al. Custo adaptativo da indução de resistência em feijoeiro mediada pela rizobactéria *Bacillus cereus* ou acibenzolar-S-metil: atividade de enzimas, síntese de fenóis e lignina e biomassa. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 2, p. 107-114, 2010.

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

LATTANZIO, V. et al. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, v. 661, n. 2, p. 23-67, 2006.

LEHMANN, S. et al. Reactive oxygen species and plant resistance to fungal pathogens. **Phytochemistry**, v. 112, p. 54-62, 2015.

LERAYER, A. et al. Guia do milho – tecnologia do campo a mesa. **Conselho de Informações sobre Biotecnologia**, p. 16, 2006.

LUIZ, C. et al. Emulsions of essential oils and aloe polysaccharides: Antimicrobial activity and resistance inducer potential against *Xanthomonas fragariae*. **Tropical Plant Pathology**, v. 42, n. 5, p. 370-381, 2017.

LUIZ, C. et al. Polysaccharides from *Aloe barbadensis* reduce the severity of bacterial spot and activate disease-related proteins in tomato. **Journal of Plant Pathology**, p. 387-393, 2012.

LUIZ, C.; NETO, A. C. R.; DI PIERO, R. M. Resistance to *Xanthomonas gardneri* in tomato leaves induced by polysaccharides from plant or microbial origin. **Journal of plant pathology**, p. 119-127, 2015.

- MANAMGODA, D. S. et al. The genus bipolaris. **Studies in mycology**, v. 79, p. 221-288, 2014.
- MANDAL, B. et al. Biological and molecular analyses of the acibenzolar-S-methyl-induced systemic acquired resistance in flue-cured tobacco against Tomato spotted wilt virus. **Phytopathology**, v. 98, n. 2, p. 196-204, 2008.
- MARRIOTT, J.; BEEN, B.O.; PERKINS, C. The aethiology vascular streaking in cassava roots after harvest: association with water loss from wounds. **Plant Physiology**, v.44, p.38-42, 1978
- MARTINEZ, A.S. **Avaliação do dano provocado por *Bipolaris maydis* em *Panicum maximum* cv. Tanzânia-1**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná. Marechal Candido Rondon, p. 33. 2006.
- MASSOLA N. S.; KRUGNER T. Fungos Patogênicos. In: KIMATI, H. et al. **Manual de Fitopatologia: Volume 2 Doenças das Plantas Cultivadas**. 4. Ed. São Paulo: Ed. Agronômica Ceres, 2005. cap 34, p. 545-589.
- MAZARO, S. M. et al. Enzimas associadas a indução de resistência em morangueiro pelo uso de quitosana e acibenzolar-s-metil. **RECEN-Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 14, n. 1, p. 91-99, 2012.
- MINJARES-FUENTES, R. et al. Compositional and structural features of the main bioactive polysaccharides present in the *Aloe vera* plant. **Journal of AOAC International**, v. 101, n. 6, p. 1711-1719, 2018.
- MOREIRA, L. R. S. et al. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 79, n. 2, p. 165, 2008.
- MORRIS, S. W. et al. Induced resistance responses in maize. **Molecular plant-microbe interactions**, v. 11, n. 7, p. 643-658, 1998.
- NEUMANN, M. M. et al. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-methyl (ASM) associado a fungicidas no controle de doenças foliares em milho. **XXXI Congresso Nacional de Milho e Sorgo: “Milho e Sorgo: inovações, mercados e segurança alimentar”** Bento Gonçalves. 2016.
- OGLIARI, J. B. **Identificação e localização de um gene de resistência de milho à *Exserohilum turcicum* (Pass.) Leonard & Suggs. através do uso de marcadores microssatélites**. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Piracicaba, p. 115. 1999.
- OLIVEIRA, E. et al. Manejo das principais doenças do milho. In: **Embrapa Milho e Sorgo- Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 6., 2006, Lavras. Manejo integrado de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo. Lavras: UFLA: DFP: NEFIT, 2006. p. 160-178., 2006.
- OLIVEIRA, J. S. Produção e utilização de silagem de milho e sorgo. **Embrapa Gado de Leite-Circular Técnica (INFOTECA-E)**, 1998.
- OOSTENDORP, M. et al. Induced disease resistance in plants by chemicals. **European Journal of Plant Pathology**, v. 107, n. 1, p. 19-28, 2001.

PANDEY R., MISHRA A. Antibacterial activities of crude extract of *Aloe barbadensis* to clinically isolated bacterial pathogens. **Applied Biochemistry and Biotechnology** v.60: p. 1356-1361. 2010.

PANDEY, V. P. et al. A comprehensive review on function and application of plant peroxidases. **Biochem. Anal. Biochem**, v. 6, n. 1, p. 2161-1009.1000308, 2017.

PARENTE, L. M. L. et al. Aloe vera: características botânicas, fitoquímicas e terapêuticas. **Arte Méd Ampl**, v. 33, n. 4, p. 160-4, 2013.

PASCHOLATI et al., 2010. Resistência Sistêmica Adquirida (SAR) x Resistência Sistêmica Induzida (ISR). In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS: INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA: NOVOS CONCEITOS E APLICAÇÕES, 09, 2010, Lavras. **Anais eletrônicos**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2010. Disponível em: <<http://www.nucleoestudo.ufla.br/nefit/livros/livro-2010.pdf>> Acesso em: 22 de jun. 2020.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defende do patógeno. In: AMORIM, L., REZENDE, J.A.M. & BERGAMIN FILHO, A. (ed.). **Manual de fitopatologia**. Vol.1. **Princípios e conceitos**. 4ed. São Paulo, Ed. Agr. Ceres, p. 593-636. 2011.

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

PAULA, D. P.; TARSITANO, M. A. A.; GRACIOLLI, L. A.. Viabilidade econômica do cultivo de shiitake em diferentes escalas de produção. **Scientia Agricola**, v. 58, n. 2, p. 431-436, 2001.

PETTOLINO, F. A. et al. Determining the polysaccharide composition of plant cell walls. **Nature protocols**, v. 7, n. 9, p. 1590-1607, 2012.

PICCININ, E. et al. Cogumelo" shiitake"(*Lentinula edodes*) reduz o crescimento de fitopatógenos e a severidade de manchas foliares em sorgo. **Summa Phytopathologica**, v. 36, n. 1, p. 68-72, 2010.

RADWAN, Deya Eldeen Mohammed et al. Protective action of salicylic acid against bean yellow mosaic virus infection in *Vicia faba* leaves. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, n. 8, p. 845-857, 2008.

SBAIHAT, L. et al. Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. **The Scientific World Journal**, v. 2015, 2015.

SCHAUFFLER, G. P. **Resistência de variedades crioulas e cultivares de milho (*Zea mays* L.) a helmintosporiose e mecanismos de defesa envolvidos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p. 91. 2019.

SILVA, R. A. et al. Defesa de plantas contra o ataque de fitopatógenos. 1ª edição. **Saropédica: Embrapa Documentos–documento**, v. 250, 2008.

SILVA, R. F.; PASCHOLATI, S. F.; BEDENDO, I. P. Indução de resistência em tomateiro por extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* contra *Ralstonia solanacearum*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 3, p. 189-196, 2007.

SINGH, R.; SRIVASTAVA, R. P. Southern Corn Leaf Blight-an important disease of maize: an extension fact sheet. **Indian Research Journal of Extension Education**, v. 12, n. 2, p. 324-327, 2016.

SITARA, U.; HASSAN, N.; NASEEM, J.. Antifungal activity of *Aloe vera* gel against plant pathogenic fungi. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, n. 4, p. 2231-2233, 2011.

SIVANESAN, A. et al. **Graminicolous species of Bipolaris, Curvularia, Drechslera, Exserohilum and their teleomorphs**. CAB International, 1987.

SOBRINHO, A. C. et al. Dinâmica de fenilalanina amonia-liase e peroxidase em feijão-caupi tratado com Acibenzolar-S-Metil. **Embrapa Meio-Norte**. In: CONGRESSO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 1.; REUNIÃO NACIONAL DE FEIJÃO-CAUPI, 6., 2006, Teresina. Tecnologias para o agronegócio: anais. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2006.

SOYLU, S.; BAYSAL, Ö.; SOYLU, E. M. Induction of disease resistance by the plant activator, acibenzolar-S-methyl (ASM), against bacterial canker (*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*) in tomato seedlings. **Plant Science**, v. 165, n. 5, p. 1069-1075, 2003.

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

STEINER, U; SCHÖNBECK, F. Induced disease resistance in monocots. In: **Induced resistance to disease in plants**. Springer, Dordrecht, 1995. p. 86-110.

THAKUR, M.; SOHAL, B. S. Role of elicitors in inducing resistance in plants against pathogen infection: a review. **ISRN biochemistry**, v. 2013, 2013.

TOLAINI, V. et al. *Lentinula edodes* enhances the biocontrol activity of *Cryptococcus laurentii* against *Penicillium expansum* contamination and patulin production in apple fruits. **International journal of food microbiology**, v. 138, n. 3, p. 243-249, 2010.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in plant science**, v. 9, n. 4, p. 203-209, 2004.

WALTERS, D. R. et al. Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, v. 95, n. 12, p. 1368-1373, 2005.

WALTERS, D. R.; FOUNTAINE, J. M. Practical application of induced resistance to plant diseases: an appraisal of effectiveness under field conditions. **The Journal of Agricultural Science**, v. 147, n. 5, p. 523-535, 2009.

WALTERS, D. R.; RATSEP, J.; HAVIS, N. D. Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of experimental botany**, v. 64, n. 5, p. 1263-1280, 2013.

WANG, J. et al. Synergistic effect of *Lentinula edodes* and *Pichia membranefaciens* on inhibition of *Penicillium expansum* infections. **Postharvest biology and technology**, v. 81, p. 7-12, 2013.

WANKE, A. et al. Plant species-specific recognition of long and short β -1, 3-linked glucans is mediated by different receptor systems. **The Plant Journal**, 2020.

WASSER, S. P. Shiitake (*Lentinus edodes*). **Encyclopedia of dietary supplements**, p. 653-664, 2005.

WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B. et al. Genetic variation among pathogens causing "Helminthosporium" diseases of rice, maize and wheat. **Fitopatologia brasileira**, v. 27, n. 6, p. 639-643, 2002.

XU, J. et al. Structural diversity requires individual optimization of ethanol concentration in polysaccharide precipitation. **International journal of biological macromolecules**, v. 67, p. 205-209, 2014.

YATES A. Yates **Garden Guide**. 42a ed. Sydney: Harper Collins; 2006.

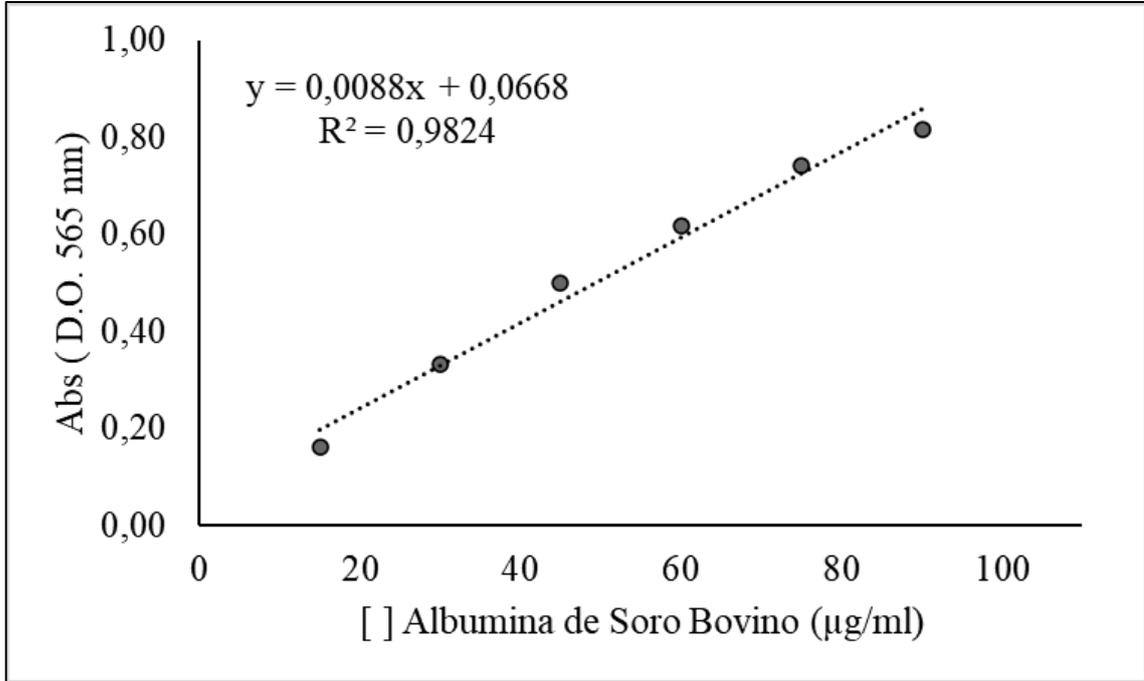
ZANOTTO, D. L.; BELLAVER, C. **Método de determinação da granulometria de ingredientes para uso em rações de suínos e aves**. Concórdia: Embrapa-CNPSA, 1996.

ZIEMANN, Sebastian et al. An apoplastic peptide activates salicylic acid signalling in maize. **Nature plants**, v. 4, n. 3, p. 172-180, 2018.

ZULUAGA, A. P.; VEGA-ARREGUÍN, J. C.; FRY, W. E. Transcriptome profile of acibenzolar-S-methyl-induced genes in tomato suggests a complex polygenic effect on resistance to *Phytophthora infestans*. **Physiological and molecular plant pathology**, v. 81, p. 97-106, 2013.

ANEXO A

Curva padrão de Albumina de Soro Bovino (BSA) para determinação de proteínas totais.



Curva padrão do Ácido Trans-cinâmico (ATC) para determinação da atividade da FAL.

