

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CAMPUS DE MARECHAL CÂNDIDO RONDON**

**CAMILA HENDGES**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Xanthomonas vasicola*  
pv. *vasculorum*, DESEMPENHO DE PRODUTOS NO CONTROLE DA DOENÇA E  
ATIVACÃO DE MECANISMOS DE DEFESA NO MILHO**

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2023**

**CAMILA HENDGES**

**MÉTODOS DE INOCULAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE *Xanthomonas vasicola*  
pv. *vasculorum*, DESEMPENHO DE PRODUTOS NO CONTROLE DA DOENÇA E  
ATIVÇÃO DE MECANISMOS DE DEFESA NO MILHO**

Tese apresentada à Universidade Estadual do Oeste do Paraná, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin

Coorientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Holanda Nozaki Mascaro

**MARECHAL CÂNDIDO RONDON - PARANÁ**

**2023**

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Hendges, Camila

Métodos de inoculação e quantificação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, desempenho de produtos no controle da doença e ativação de mecanismos de defesa no milho / Camila Hendges; orientador José Renato Stangarlin; coorientador Márcia de Holanda Nozaki Mascaró. -- Marechal Cândido Rondon, 2023.

77 p.

Tese (Doutorado Campus de Marechal Cândido Rondon) -- Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, 2023.

1. Estria bacteriana. 2. Indução de resistência. 3. Controle alternativo. I. Stangarlin, José Renato, orient. II. Mascaró, Márcia de Holanda Nozaki, coorient. III. Título.



**unioeste**

Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Campus de Marechal Cândido Rondon - CNPJ 78680337/0003-46  
Rua Pernambuco, 1777 - Centro - Cx. P. 91 - <http://www.unioeste.br>  
Fone: (45) 3284-7878 - Fax: (45) 3284-7879 - CEP 85960-000  
Marechal Cândido Rondon - PR.



## CAMILA HENDGES

Métodos de inoculação e quantificação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*,  
desempenho de produtos no controle da doença e ativação de mecanismos de  
defesa do milho

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia em  
cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutora em Agronomia,  
área de concentração Produção Vegetal, linha de pesquisa Fitossanidade e Controle  
Alternativo, APROVADA pela seguinte banca examinadora:

  
Orientador - José Renato Stangarlin

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

  
Odair José Kuhn

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

  
Antonio Carlos Torres da Costa

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Marechal Cândido Rondon (UNIOESTE)

Clair Aparecida Viecelli

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Briolimp Ltda

  
Roberto Luis Portz

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Marechal Cândido Rondon, 20 de abril de 2023

À Deus pela vida e pelas bênçãos durante a caminhada!  
À minha família por me apoiar, acreditar no meu potencial e me dar forças!

DEDICO

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Santíssima Trindade, pelo dom da vida, por me guiar e proteger meus caminhos e me dar forças para seguir sempre.

Agradeço ao meu esposo, Donizete Batista Carmelo, pela paciência e apoio técnico e emocional durante esta caminhada de altos e baixos.

Agradeço aos meus pais, Semilda Nies Hendges e João Hendges que me deram motivações para seguir na vida acadêmica e sempre acreditaram no meu potencial.

A minha irmã Caroline Hendges, meu cunhado Bruno Fernandes e meu sobrinho/afilhado Heitor Hendges Fernandes por me apoiar e tornar meus dias mais felizes.

Ao meu professor e orientador Professor Doutor José Renato Stangarlin, minha imensa gratidão durante todos estes anos de pós-graduação, pela paciência, sabedoria, comprometimento e profissionalismo. Eu te admiro professor.

A minha coorientadora Professora Doutora Márcia de Holanda Nozaki Mascaro por me acompanhar durante mais de uma década e me encorajar.

Ao Professor Doutor Odair José Kuhn pelos ensinamentos, prestatividade e bons conselhos, minha gratidão.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (PPGA) e a Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE) por possibilitar a realização deste curso.

A todo corpo docente do PPGA, por compartilhamento os conhecimentos.

Aos funcionários da UNIOESTE, pela disposição.

A todos os membros do grupo de pesquisa Controles Biológico e Alternativo em Fitossanidade (COBALFI) e amigos da pós-graduação que me ajudaram inúmeras vezes.

A Leila Dirlene Allievi Werlang pela empatia e agilidade.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de doutorado.

A Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), campus Toledo, por disponibilizar suas dependências para a condução dos ensaios.

Aos funcionários da PUCPR (Professor Doutor Jacir Daga, Luiz Fernando Formighieri, Marciele Solera, Danielle Deicke, Debora Borth Moratelli, José Domingos

e Zélia Melato Alves) por me auxiliarem durante os ensaios, meu grande agradecimento.

Agradeço também a todas aquelas pessoas que direta ou indiretamente me incentivaram e auxiliaram durante esta caminhada.

Muito obrigada!

## RESUMO

HENDGES, Camila, MSc., Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Abril – 2023. **Métodos de inoculação e quantificação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, desempenho de produtos no controle da doença e ativação de mecanismos de defesa no milho.** Orientador: Prof. Dr. José Renato Stangarlin. Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Holanda Nozaki Mascaro.

As doenças foliares do milho têm potencial para reduzir a produtividade deste grão, como a estria bacteriana, causada pela bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*), para a qual há poucos estudos disponíveis na literatura. Este trabalho objetivou avaliar métodos de inoculação e quantificação de *Xvv*, verificar o desempenho de produtos no controle da doença e na ativação de mecanismos de defesa no milho. Os experimentos realizados em casa de vegetação foram em delineamento blocos casualizados e em laboratório com delineamento inteiramente casualizado, ambos com cinco repetições. Para avaliar os métodos de inoculação da bactéria *Xvv*, o híbrido P4285 VYHR foi inoculado via aspersão, via hidatódios, ferimentos no colmo e na folha, deposição de inóculo no cartucho e testemunha (não inoculada). Em seguida, o experimento de quantidade de inóculo de *Xvv* foi conduzido com os tratamentos 0,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) mL<sup>-1</sup>. Para avaliar o efeito antibiótico dos produtos All Crim®, Bion®, Curative®, óleo essencial de melaleuca, Serenade®, Status® e Stop®, foi implantado ensaio *in vitro* para determinar a dose de maior controle e, posteriormente, realizado o ensaio *in vivo*. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas, *in vitro* avaliou-se a presença e tamanho do halo de inibição da bactéria e *in vivo* avaliou-se a área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD). O experimento de análise bioquímica foi realizado em delineamento blocos casualizados em esquema fatorial 4x7 (quatro tratamentos: All Crim®, Curative®, Bion® e testemunha, e sete tempos de coleta: 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas), com três repetições, sendo avaliado atividade de peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO) e fenilalanina amônia-liase (FAL). Os métodos de inoculação que proporcionaram as maiores AACPD foram via aspersão e inóculo no cartucho, sendo que na inoculação via hidatódios não foi promissora para o surgimento de sintomas. O experimento para avaliar concentrações da bactéria apresentou



comportamento quadrático com ponto de máxima em  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, proporcionando a maior AACPD. Os produtos All Crim®, Curative® e Bion® não apresentaram halo de inibição do crescimento bacteriano em todas as doses utilizadas, em contraposição, os produtos Status®, óleo essencial de melaleuca e Serenade® apresentaram halo de inibição na dose mais baixa até a mais alta utilizada no experimento. O Stop®, por sua vez, apresentou efeito quadrático. No ensaio *in vivo*, os produtos All Crim®, Curative®, Bion® apresentaram as menores AACPD tanto na terceira (tratada e inoculada) quanto na quarta (apenas inoculada) folha de milho, apresentando comportamentos local e sistêmico. Incrementos na atividade de POX, PFO e FAL foram observados com os tratamentos All Crim®, Curative® e Bion®. Esses resultados indicam o potencial da indução de resistência no milho como complemento para o controle da estria bacteriana, sugerindo-se ainda estudos mais aprofundados, como a ativação de outras enzimas de defesa e avaliação do comportamento do milho com outras doses dos produtos.

**Palavras-chaves:** Estria bacteriana. Indução de resistência. Controle alternativo.

## ABSTRACT

HENDGES, Camila, MSc. Universidade Estadual do Oeste do Paraná, April – 2023.  
**Methods of inoculation and quantification of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, performance of products on disease control and activation of plant defense mechanisms in corn.** Advisor: Prof. Dr. José Renato Stangarlin. Co-advisor: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia de Holanda Nozaki Mascaro.

Maize foliar diseases have potential to reduce the production of this grain, such as bacterial leaf streak, caused by the bacterium *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (*Xvv*), for which there are few studies available in the literature. This work aimed to evaluate methods of inoculation and quantification of *Xvv*, verify the performance of products in controlling the disease and in activating defense mechanisms in maize. The experiments were carried out in a greenhouse with a randomized block design and in the laboratory with a completely randomized design, both with five replications. To evaluate the *Xvv* bacteria inoculation methods, the hybrid P4285 VYHR was inoculated by leaf spraying, in hydathodes, stalk wounds, leaf wounds, deposition of the inoculum within the whorl and control (non-inoculated). Then, the *Xvv* inoculum amount experiment was conducted with treatments 0,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  and  $10^9$  colony forming units (CFU) mL<sup>-1</sup>. To evaluate the antibiotic effect of the All Crim®, Bion®, Curative®, tea tree essential oil, Serenade®, Status® and Stop® products, an *in vitro* test was implemented to determine the highest control dose and, subsequently, the test was carried out *in vivo*. All assays were performed in duplicates, *in vitro* the presence and size of the bacterial inhibition zone were evaluated and *in vivo* the area under the disease progress curve (AUDPC) was evaluated. The biochemical analysis experiment was carried out in a randomized block design in a 4x7 factorial scheme (four treatments: All Crim®, Curative®, Bion® and control, and seven collection times: 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 hours), with three replicates, evaluating peroxidase (POX), polyphenoloxidase (PPO) and phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity. The inoculation methods that provided the highest AUDPC were leaf spraying and inoculum within the whorl, and the inoculation via hydathodes was not promising for the appearance of symptoms. The experiment to evaluate bacterial concentrations showed a quadratic behavior with a maximum point at  $1 \times 10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>, providing the

highest AUDPC. The All Crim®, Curative® and Bion® products did not show a halo of inhibition of bacterial growth at all doses used, in contrast, the products Status®, essential oil of tea tree and Serenade® showed a halo of inhibition at the lowest dose up to highest used in the experiment. The Stop®, in turn, presented a quadratic effect. In the *in vivo* test, All Crim®, Curative®, Bion® products showed the lowest AUDPC both in the third (treated and inoculated) and in the fourth (only inoculated) maize leaf, presenting a local and systemic behavior. Increase in POX, PPO and PAL activity was observed with All Crim®, Curative® and Bion® treatments. These results indicate the potential of inducing resistance in maize as a complement to control bacterial leaf streak, suggesting further studies, such as the activation of other defense enzymes and evaluation of maize behavior with other product doses.

**Keywords:** Bacterial leaf streak. Resistance induction. Alternative control.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Curva de concentração bacteriana de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, baseada em unidades formadoras de colônia e absorbância a 580 nm. .... 16
- Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho em função de métodos de inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Toledo (PR), setembro de 2020 (A) e novembro de 2020 (B). Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância. .... 24
- Figura 3 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho inoculadas com concentrações de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Toledo (PR), janeiro de 2021 (A) e fevereiro de 2021 (B). .... 27
- Figura 4 - Halo inibitório (cm) de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* na presença das doses 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6x dos produtos Stop® (A), Status® (B), óleo essencial de melaleuca (C) e Serenade® (D). .... 31
- Figura 5 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho tratada (F3) e não tratada (F4) com All Crim®, Curative®, Bion®, Stop®, Status®, óleo essencial de melaleuca, Serenade® e testemunha, e inoculadas com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Toledo (PR), maio de 2021 (A) e junho de 2021 (B). Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras maiúsculas para comparação dos tratamentos na terceira folha; letras minúsculas para comparação dos tratamentos na quarta folha; letras gregas para comparação entre a terceira e quarta folha de cada tratamento); ns: não significativo. .... 34
- Figura 6 - Atividade de peroxidase em milho tratado com All Crim®, Curative® e Bion®. Os tratamentos foram realizados na terceira folha expandida 72 horas antes da inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que ocorreu na terceira (A) e quarta folhas expandidas (B). A testemunha corresponde a plantas não tratadas e

inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação do patógeno, 72 horas após o tratamento. Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras latinas para comparação dos tratamentos dentro de cada tempo; letras gregas para comparação entre os tempos dentro de um tratamento); ns: não significativo. .... 40

Figura 7 - Atividade de polifenoloxidase em milho tratado com All Crim®, Curative® e Bion®. Os tratamentos foram realizados na terceira folha expandida 72 horas antes da inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que ocorreu na terceira (A) e quarta folhas expandidas (B). A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação do patógeno, 72 horas após o tratamento. Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras latinas para comparação dos tratamentos dentro de cada tempo; letras gregas para comparação entre os tempos dentro de um tratamento); ns: não significativo. .... 44

Figura 8 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em milho tratado com All Crim®, Curative® e Bion®. Os tratamentos foram realizados na terceira folha expandida 72 horas antes da inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que ocorreu na terceira (A) e quarta folha expandida (B). A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação do patógeno, 72 horas após o tratamento. Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras latinas para comparação dos tratamentos dentro de cada tempo; letras gregas para comparação entre os tempos dentro de um tratamento)..... 47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Nome comercial, classe e ingrediente ativo/composição dos produtos utilizados para avaliar a sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> .....	18
Tabela 2 - Doses dos produtos utilizados para avaliar a sensibilidade <i>in vitro</i> de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> para 100 mL de água.....	19
Tabela 3 - Formação de halo de inibição do crescimento bacteriano <i>in vitro</i> de <i>Xanthomonas vasicola</i> pv. <i>vasculorum</i> para as doses 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6x dos produtos All Crim®, Curative®, Bion®, Stop®, Status®, óleo essencial de melaleuca e Serenade®.....	29

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1	A CULTURA DO MILHO .....	3
2.2	DOENÇAS FOLIARES DO MILHO .....	4
2.2.1	Estria bacteriana do milho .....	5
2.3	CONTROLE DAS DOENÇAS EM PLANTAS .....	7
2.3.1	Indução de resistência .....	7
2.3.1.1	Agentes indutores de resistência .....	10
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
3.1	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO ISOLADO.....	14
3.2	CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA .....	15
3.3	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> – MÉTODOS DE INOCULAÇÃO .....	16
3.4	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> – QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO .....	17
3.5	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i> – SENSIBILIDADE À PRODUTOS .....	17
3.6	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> – CONTROLE DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO.....	19
3.7	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	20
3.7.1	Obtenção do tecido foliar e extrato enzimático .....	21
3.7.2	Teor de proteínas.....	22
3.7.3	Atividade de peroxidase .....	22
3.7.4	Atividade de polifenoloxidase .....	22
3.7.5	Atividade de fenilalanina amônia-liase .....	23
3.7.6	Análise estatística .....	23
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>24</b>
4.1	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> – MÉTODOS DE INOCULAÇÃO .....	24
4.2	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> – QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO.....	26
4.3	EXPERIMENTO <i>IN VITRO</i> – SENSIBILIDADE À PRODUTOS.....	28
4.4	EXPERIMENTO <i>IN VIVO</i> – CONTROLE DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO.....	33
4.5	ANÁLISE BIOQUÍMICA.....	39
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....51**



## 1 INTRODUÇÃO

O milho é considerado o cereal mais importante do mundo devido a sua diversidade de utilização, sendo mais de 150 produtos industriais fabricados com derivados deste grão, tornando-o um aliado na alimentação humana e animal devido à sua elevada composição energética (STRAZZI, 2015).

Com a terceira posição no ranking mundial de produção de milho, o Brasil produziu aproximadamente 115,2 milhões de toneladas na safra 2021/2022. O estado do Mato Grosso lidera a produção nacional com 35,5% da produção, seguido pelo estado do Paraná com 16,5% (CONAB, 2022).

A larga escala de produção do milho é favorecida pelo clima tropical brasileiro, permitindo o cultivo em duas safras durante o ano (LEITE JÚNIOR et al., 2018a). Em contrapartida, a ocorrência de doenças também é favorecida, principalmente em locais de monocultivo, proporcionando hospedeiro constante para o patógeno, limitando a qualidade e produtividade do grão.

Dentre as doenças do milho, a estria bacteriana, cujo agente causal é a bactéria *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, foi reportada primeiramente na África do Sul em 1949 (DYER, 1949) e diagnosticada em 2010 na América Latina, na Argentina (PLAZAS et al., 2018). Já no Brasil, a doença foi reportada no ano de 2016, porém, ganhou maior atenção do meio agrícola brasileiro em 2018 após expressiva severidade no oeste do Paraná (LEITE JÚNIOR et al., 2018b).

Os sintomas iniciais no tecido foliar apresentam-se em forma de pontuações pequenas e translúcidas que podem evoluir para lesões alongadas e estreitas de coloração amarela. Sua principal característica para diferenciar da doença fúngica cercosporiose, são as bordas das lesões em formato ondulado. Além disso, a doença pode se desenvolver nas brácteas das espigas (LEITE JÚNIOR et al., 2018a) e a severidade pode atingir mais de 50% da área foliar (BRODERS, 2017).

As informações sobre a estria bacteriana do milho, principalmente sobre a prevenção e o controle ainda são escassas na literatura, sendo que as recomendações de controle são empregadas de acordo com as medidas gerais de controle de doenças causadas por bactérias, como rotação de cultura, controle de plantas hospedeiras alternativas, evitar a utilização de híbridos altamente suscetíveis à doença e desinfestação de maquinários, entre outras medidas (LEITE JÚNIOR et al., 2018a).

Desta maneira, a indução de resistência torna-se um aliado para evitar ou retardar a entrada e/ou a subsequente atividade do patógeno no tecido vegetal, em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos. Essa medida de controle, assim como as demais, raramente é completa, sendo que os indutores de resistência em geral, apresentam entre 20% e 85% de controle em relação às plantas não induzidas (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

A indução de resistência pode ser ativada nas plantas através de compostos presentes em óleos essenciais (HENDGES et al., 2021; SILVA et al., 2017), produtos com cobre na composição (COSTA et al., 2017a; COSTA et al., 2017b), *Bacillus subtilis* (ALVES et al., 2020; REZENDE et al., 2021), acibenzolar-S-metil (ITAKO et al., 2012; LIMA et al., 2020; SIQUEIRA et al., 2019) e produtos à base de alecrim (ASSI et al., 2018; MAIA et al., 2014; MENEZES et al., 2009).

Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar métodos de inoculação e quantificação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, além de verificar o comportamento de produtos no controle da estria bacteriana e ativação de mecanismos de defesa no milho.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A CULTURA DO MILHO

O milho (*Zea mays* L.) é uma gramínea anual, pertencente à família Poaceae e nativo da América Central, possuindo um metabolismo fotossintético C4, classificado como angiosperma e monocotiledônea. Devido a sua alta adaptabilidade é amplamente cultivado em diversas partes do mundo, sendo encontrado em climas tropicais, subtropicais e temperados (BARROS; CALADO, 2014). Considerando o valor nutricional e a grande diversidade de produtos derivados do grão, o milho é consumido em todo o mundo, tanto para alimentação animal quanto humana (CHAGAS et al., 2015).

O Brasil ocupa a terceira posição mundial na produção de milho, atrás do Estados Unidos e China, sendo seu cultivo ocorrente principalmente nas regiões Sul e Centro-Oeste (CONAB, 2022; USDA, 2021). A cultura é exigente em tecnologia, como o uso de híbridos resistentes, irrigação e adubação de qualidade. Com a diversificação climática das regiões de cultivo, o surgimento de doenças é comum, sendo muitos patógenos identificados na cultura (CARVALHO; PEREIRA; CAMARGO, 2016).

A cultura tem seu ciclo de desenvolvimento dividido em duas fases: vegetativo (V) e reprodutivo (R). O estágio vegetativo tem início com a emergência das plântulas (Ve) e posteriormente os estádios são denominados de acordo com o número de folhas totalmente expandidas (V1, V2, V3, Vn), sendo que Vn corresponde à última folha expandida antes do pendoamento. O pendoamento (Vt) representa a última fase do estágio vegetativo. O estágio reprodutivo é representado por R1 (embonecamento e polinização), R2 (grão bolha d'água), R3 (grão leitoso), R4 (grão pastoso), R5 (formação de dente) e R6 (maturidade fisiológica) (MAGALHÃES; DURÃES, 2006).

Em relação as condições ambientais, as sementes do milho emergem em torno de 5 ou 6 dias, dependendo da temperatura do solo. Durante o estágio vegetativo até a floração, as temperaturas consideradas ótimas variam de 24 a 30 °C, sendo que temperaturas inferiores a 10 °C e superiores a 32 °C podem ser prejudiciais para a cultura (BARROS; CALADO, 2014). A cultura do milho é exigente em água, consumindo em torno de 600 milímetros durante seu ciclo, variando de acordo com

as condições climáticas do local cultivado, ciclo da cultura, tipo de solo e outros fatores (ANDRADE et al., 2006; CRUZ et al., 2010).

O ciclo da cultura do milho é caracterizado de acordo com a somatória térmica (graus-dias (G.D.)) necessária para atingir a maturação fisiológica e completar o ciclo. Cada híbrido apresenta uma necessidade específica e constante de unidades de calor, sendo classificados em três grupos: superprecoces ( $\leq 830$  G.D.), precoces (831 a 890 G.D.) e normais ( $\geq 891$  G.D.). Logo, para que ocorra a máxima expressão do potencial genético, a cultura do milho necessita de níveis considerados ótimos para diversos fatores, principalmente temperatura, precipitação pluviométrica e fotoperíodo (CRUZ et al., 2010).

A evolução do sistema de produção do milho está interligada com a evolução das doenças desta cultura, e as mudanças que proporcionaram aumentos na produção também geraram aumento na incidência e severidade das doenças. Entre os fatores, pode-se citar a expansão da fronteira agrícola, ampliação das épocas de semeadura, ausência de rotação de culturas, uso de materiais suscetíveis, entre outros, que são importantes na dinâmica populacional de patógenos, surgindo assim novas doenças para a cultura (EMBRAPA, 2015).

## 2.2 DOENÇAS FOLIARES DO MILHO

As doenças foliares causam danos decorrentes da limitação ou destruição dos tecidos fotossintéticos, devido ao número e área das lesões que podem resultar em necrose de toda a folha em determinados casos (BEDENDO, 2018). A maior parte da matéria seca do milho é oriunda da fixação de  $\text{CO}_2$  pelo processo fotossintético, logo, essa limitação da interceptação da radiação solar pode ocasionar redução da produtividade (CRUZ et al., 2010).

As folhas do terço médio do milho correspondem entre 33% e 40% da área foliar total da planta, por representarem a relação fonte-dreno em relação à espiga (PATAKY, 1992). Quando a cultura do milho tem redução de até 25% na taxa diária de radiação solar, a produtividade da cultura pode ser afetada em até 7,8%, e diante de um cenário onde a profundidade do sistema radicular é limitada, associado a diminuição da radiação solar, as reduções da produtividade de grãos de milho podem atingir até 30% (AMARAL et al., 2014).

As doenças foliares são potenciais expressivos de prejuízo para a cultura do milho. Dentre elas, pode-se citar a mancha de bipolaris (*Bipolaris maydis*), mancha de diplodia (*Stenocarpella macrospora*), ferrugem branca (*Physopella zaeae*), ferrugem comum (*Puccinia sorghi*) e antracnose foliar (*Colletotrichum graminicola*). Outras doenças foliares que ocorrem no estado do Paraná em maior quantidade são: mancha branca (*Phaeosphaeria maydis/Pantoea ananatis*), cercosporiose (*Cercospora zaeae-maydis*), helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*), ferrugem polissora (*Puccinia polysora*) e mais recentemente a estria bacteriana do milho (*Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*) (CARVALHO; PEREIRA; CAMARGO, 2016).

A interação de alguns fatores é fundamental para ocorrência de doenças em plantas, como hospedeiro suscetível, presença do patógeno virulento e ambiente favorável, denominados como triângulo da doença. Esses componentes afetam diretamente a sobrevivência, disseminação, infecção, colonização e reprodução dos patógenos (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2018).

### 2.2.1 Estria bacteriana do milho

A doença estria bacteriana foi reportada pela primeira vez no ano de 1949 na África do Sul em lavouras de milho (DYER, 1949). Posteriormente, no Estados Unidos em 2014 e 2015 surgiram sintomas da doença na cultura do milho relatados por Korus et al. (2017), onde causou danos severos na cultura em diversos estados do país. Na América Latina, a doença foi documentada na Argentina, onde sintomas eram observados desde 2010 (PLAZAS et al., 2018).

Os sintomas iniciais observados no Brasil foram em 2016 na Região Oeste do Paraná por pesquisadores do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR), com expressivo aumento na safra de 2018/2018. A doença foi observada em condições naturais de ocorrência em diversos híbridos comerciais de milho no estágio fenológico reprodutivo (LEITE JÚNIOR et al., 2018b).

Durante certo período houve divergências quanto à nomenclatura do patógeno causador da estria bacteriana no milho, sendo denominado *Xanthomonas campestris* pv. *vasculorum*, *X. c.* pv. *zaeae* ou *X. vasicola*. Diante de um estudo, Lang et al. (2017) analisaram a identidade do patógeno causador de estria bacteriana no milho por meio de análises filogenéticas, comparações de genomas e estudos de patogenicidade comparativos com isolados do Estados Unidos e da África do Sul. Os

autores propuseram uma nova designação taxonômica deste patógeno para *X. vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894), sendo essa classificação utilizada até os dias atuais.

*X. vasicola* pv. *vasculorum* é uma bactéria gram-negativa com formato de bastonete, não fluorescente e não fermentativa, com crescimento em meio de cultura ágar-nutriente, apresentando colônias mucóides com coloração amarela, característico das bactérias do gênero *Xanthomonas* (LEITE JÚNIOR et al., 2018b).

A sintomatologia da estria bacteriana do milho pode ser observada nas plantas ainda no estágio vegetativo, consistindo na presença inicial de pequenas pontuações (2-3 mm) nas folhas, evoluindo para lesões alongadas e estreitas, circundadas por halo de coloração amarelada e restritas às regiões internervais, com as bordas das lesões onduladas. Quando observadas contra a luz, as lesões são translúcidas. Pode se estender ao longo do tecido foliar e normalmente limitadas pela nervura principal, apresentando coloração marrom ou amarelo alaranjado, sendo que, em casos mais severos as lesões podem afetar toda a área foliar formando uma área necrótica. A doença também pode se desenvolver nas brácteas das espigas da planta (LEITE JÚNIOR et al., 2018b).

A bactéria *X. vasicola* pv. *vasculorum* pode sobreviver em restos culturais infectados e plantas daninhas (ORTIZ-CASTRO et al., 2020) e também em plantas alternativas como aveia (*Avena sativa*), arroz (*Oryza sativa*), capim massambará (*Sorghum halepense*), capim junça (*Cyperus esculentus*) (HARTMAN et al., 2020b) e sorgo (*Sorghum bicolor*) (LANG et al., 2017). As sementes também são veículos potenciais para sobrevivência e disseminação do patógeno (ARIAS et al., 2020).

As bactérias em geral não possuem estruturas especializadas de penetração e, conseqüentemente, não são capazes de penetrar diretamente no hospedeiro. Sendo assim, a infecção da espécie *X. vasicola* pv. *vasculorum* pode ocorrer por aberturas naturais (estômatos e hidatódios nas folhas) e também por ferimentos que podem ser causados pela abrasão entre as folhas, pelo vento e pela chuva (AMORIM; PASCHOLATI, 2018).

Outro fator importante no processo infeccioso de um patógeno é a quantidade de inóculo, onde, geralmente, o aumento da concentração ocasiona proporcionalmente o aumento da taxa de infecção (SILVEIRA; MICHEREFF; MARIANO, 2003). Por outro lado, existem patógenos que atingem o máximo nível de doença em baixas concentrações de inóculo (SILVEIRA et al., 2001). Logo, é

importante o estabelecimento da concentração ideal do inóculo para possibilitar a reprodução dos sintomas em estudos de patogenicidade, genéticos, epidemiológicos e de controle.

Os danos causados pela estria bacteriana na cultura do milho são determinados principalmente pelo tipo de irrigação, rotação de culturas, tipo de preparo e estágio fenológico da cultura (HARTMAN et al., 2020a). No Estados Unidos, a doença atingiu níveis acima de 90% de incidência e em determinadas áreas a severidade alcançou 50% da área foliar (BRODERS, 2017).

As medidas de prevenção e controle da estria bacteriana do milho baseiam-se nas medidas gerais de controle de doença, com foco em bactérias, uma vez que, ainda são escassos os estudos com controle químico ou biológico para esta relação patógeno-hospedeiro (LEITE JÚNIOR et al., 2018a).

## 2.3 CONTROLE DAS DOENÇAS EM PLANTAS

O controle das doenças pode ser realizado de diversas formas através da utilização de métodos de controle (genético, cultural, físico, biológico e químico), que atuam tanto no patógeno, no ambiente e/ou sobre o hospedeiro (BERGAMIN FILHO; AMORIM, 2018).

Mesmo com inúmeras estratégias de controle, adota-se principalmente o uso do manejo químico devido a sua alta eficiência e praticidade (DUARTE; JULIATTI; FREITAS, 2009). Porém, a adoção de produtos químicos, além da possibilidade de causar danos ao meio ambiente e à saúde do aplicador, tem-se poucos estudos sobre a eficiência no controle de bacterioses do milho.

O controle alternativo, por sua vez, apresenta-se como uma opção ao controle de doenças, abrangendo o controle biológico e a indução dos mecanismos de resistência das plantas. Desta maneira, o uso de métodos alternativos para o controle de doenças abrange um menor impacto ambiental, preservação da saúde do ser humano e também menor impacto na biodiversidade (MORAES, 1992).

### 2.3.1 Indução de resistência

A indução de resistência em plantas corresponde à ativação de mecanismos de defesa latentes em resposta ao tratamento com agentes bióticos ou abióticos, sem

alterar o genoma da planta (STADNIK, 2000). Os agentes indutores desencadeiam respostas bioquímicas, por meio de substâncias que protegem as células e tecidos, criando assim, condições desfavoráveis para o crescimento do patógeno, sendo o eliciador a molécula responsável pela ativação do mecanismo de defesa. A sua natureza não apresenta uma característica química ou estrutural em comum, podendo ser oligossacarídeos, glicoproteínas, oligopeptídeos ou ácidos graxos (AGRIOS, 2005; STANGARLIN et al., 2011).

As respostas bioquímicas ocorrem por meio de mecanismos de defesa que podem ser pré-formados ou pós-formados, sendo que estes últimos possuem papel fundamental na indução de resistência. Os mecanismos pré-formados já estão presentes nas plantas antes do contato com o patógeno. Os pós-formados, por sua vez, estão ausentes ou presentes em baixos níveis antes da infecção do patógeno e são ativados quando a planta reconhece os sinais emitidos por um patógeno ou agente indutor, quando em contato com a planta (PASCHOLATI; DALIO, 2018).

A indução de resistência pode se manifestar no local da aplicação do agente indutor e penetração do patógeno ou de maneira sistêmica, pois os sinais podem ser transmitidos para locais distantes do sítio de reconhecimento. A duração do efeito indutor varia de acordo com o agente indutor e da planta utilizada, podendo durar poucos dias, semanas ou até mesmo todo o ciclo da cultura (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Em função da rota de sinalização que leva à expressão das defesas, a indução de resistência pode ser dividida em resistência sistêmica adquirida (SAR) e resistência sistêmica induzida (ISR) (FU; DONG, 2013).

A SAR, induzida por patógenos necrotróficos (agentes bióticos) e também por agentes abióticos, é controlada por um caminho de sinalização dependente do acúmulo de ácido salicílico e da proteína de regulação NPR1. A ISR por sua vez, é induzida por bactérias promotoras de crescimento (rizobactérias) e bactérias não-patogênicas, sendo regulada pelo ácido jasmônico ou etileno, independente do ácido salicílico, porém requer a proteína NPR1 (AGRIOS, 2005; PASCHOLATI; DALIO, 2018).

As alterações na atividade enzimática nos metabolismos primário e secundário podem ser decorrentes de alterações metabólicas provocadas pelos mecanismos de defesa das plantas contra fitopatógenos, envolvendo enzimas como peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase (STANGARLIN et al., 2011).



A enzima peroxidase (POX; E.C. 1.11.1.7) ocorre em tecidos de plantas, células animais e microrganismos, atuando em diversos processos fisiológicos: responsável pela catálise da redução de peróxido de hidrogênio (ZÁMOCKÝ et al., 2001); biossíntese de etileno (MEHLHORN, 1990); senescência das folhas (KAR; MISHRA, 1976); catalisa a oxidação e possível polimerização de álcool hidroxicinâmico na presença de peróxido de hidrogênio, formando lignina, que pode dificultar a penetração do patógeno na parede celular (STANGARLIN et al., 2011).

As peroxidases são classificadas como proteínas relacionadas a patogênese (proteínas-RP) pertencentes a família PR-9, em diversas isoformas, localizadas principalmente na parede celular e no vacúolo. As proteínas-RP são induzidas em resposta a diversas situações, como déficit hídrico, salinidade, injúrias, metal pesado, tratamento com agentes indutores endógenos e exógenos, e reguladores de desenvolvimento vegetal, entre outros (PASCHOLATI; DALIO, 2018; SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

A polifenoloxidase (PFO; E.C. 1.10.3.2) é amplamente distribuída entre as espécies de plantas, bactérias, fungos e algas, sendo geralmente encontrada em abundância em tecidos atacados por insetos ou patógenos. Esta enzima atua na resistência a doenças por meio da sua capacidade de oxidar compostos fenólicos em quinonas altamente tóxicas a microrganismos (AGRIOS, 2005).

Conforme ocorre a ruptura celular ocasionada por ferimentos, ação de insetos, patógenos e até mesmo senescência, as polifenoloxidases oxidam os compostos fenólicos que são liberados no vacúolo, produzindo quinonas com ação antimicrobiana. A PFO atua também no processo de lignificação durante a invasão do patógeno (MOHAMMADI; KAZEMI, 2002; THIYAPONG; HUNT; STEFFENS, 2004).

A fenilalanina amônia-liase (FAL; E.C. 4.3.1.5) é uma enzima do metabolismo secundário, encontrada em plantas superiores, algumas bactérias e também em fungos, porém, não ocorre em animais (RÖSLER et al., 1997; XIANG; MOORE, 2005). Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, oriundo da rota do ácido chiquímico, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; PASCHOLATI, 2008).

O ácido *trans*-cinâmico é precursor de compostos fenilpropanoides que realizam funções essenciais na planta, incluindo a lignina e fitoalexinas fenólicas envolvidas no processo de defesa da planta (HAHLBROCK; SCHEEL, 1989; JONES, 1984). A FAL origina precursores de compostos fenólicos, que por sua vez, se

acumulam em resposta à infecção, como por exemplo, a lignina (ALMEIDA et al., 2012).

### 2.3.1.1 Agentes indutores de resistência

Os agentes indutores podem ter diversas origens e podem ser aplicados em casa de vegetação ou em condições de campo, sendo que diversas vantagens podem ser exploradas, como: ampla efetividade microbiana (vírus, bactérias, fungos e nematoides); estabilidade devido à diferentes mecanismos de resistência serem ativados; caráter sistêmico; transmissão por enxertia e ainda a economia de energia metabólica, o que permite que a planta ative suas defesas com mais rapidez quando submetida a algum estresse (PASCHOLATI; DALIO, 2018). Diante deste cenário, vários produtos vem sendo avaliados como indutores de resistência em diversos patossistemas.

Os óleos essenciais têm apresentado resultados satisfatórios em pesquisas com indução de resistência de plantas, e um exemplo é a utilização de óleo essencial de melaleuca em tomateiro contra *Alternaria solani*, onde se observou aumento da atividade enzimática da planta, promovendo uma redução de até 53% dos sintomas da doença em folhas tratadas e 42% em folhas não tratadas (HENDGES et al., 2021).

O estudo de óleos essenciais para indução de resistência no milho ainda não está consolidado no Brasil e no mundo, porém, resultados promissores já foram publicados por Veloso et al. (2018). Os autores observaram que o óleo essencial de *Morinda citrifolia* pode desempenhar um importante papel no controle das doenças *Bipolaris maydis* e *Exserohilum turcicum* no milho, através da ativação de enzimas de defesa.

Acibenzolar-S-metil (ASM), por sua vez, foi registrado como ativador de plantas em 1995, após a possibilidade de utilização como indutor de resistência e, desde então, diversas pesquisas comprovaram sua atividade. Siqueira et al. (2019) avaliaram doses de ASM em feijão caupi contra o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*. Os autores concluíram que as maiores doses de ASM (0,45 e 0,60 g L<sup>-1</sup>) proporcionaram maior atividade enzimática e resistência das plantas de feijão.

Lima et al. (2020) também constatou que o ASM auxilia na resistência sistêmica de plantas de tomate submetidas ao estresse hídrico, através da ativação das enzimas peroxidase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e  $\beta$ -1,3-

glucanase. Além disso, ainda houve incremento da produção de massa fresca, seca, taxa fotossintética e condutância estomática.

Em relação a cultura do milho, o ASM reduziu em 12,2% o progresso da doença mancha branca com duas aplicações (nos estádios vegetativos V7 e V10). Já para a doença helmintosporiose, o resultado também foi positivo, reduzindo em 12,3% a área abaixo da curva de progresso da doença com uma aplicação de ASM (estádio V7) e também com duas aplicações (V7 e V10) (NEUMANN et al., 2016).

Fontoura et al. (2015) avaliaram a indução de resistência na cultura do milho com os indutores acibenzolar-S-metil e mananoligossacarídeo fosforilado (MOS) para ferrugem polissora e helmintosporiose, onde não observaram resultados significativos para resposta de hipersensibilidade com o ASM. Em contrapartida o MOS aumentou a intensidade da resposta de hipersensibilidade, sem afetar a produtividade do grão em relação ao tratamento controle (água).

Os produtos bióticos também apresentam importante papel na indução de resistência das plantas, como por exemplo, as bactérias do gênero *Bacillus* que além de promoverem o crescimento das plantas, atuam na ativação de mecanismos de defesa da planta (COMPANT et al., 2005).

Os autores Chowdappa et al. (2013) observaram aumento da resistência em mudas de tomateiro com a utilização de *Bacillus subtilis*. O tamanho das lesões causadas por *Alternaria solani* e *Phytophthora infestans* foi reduzido em 50,76% e 67,33%, respectivamente, em relação ao controle (não tratado).

A inoculação de sementes de milho com *Bacillus subtilis* diminuiu a severidade de *Sporisorium reilianum* em até 47,6%, mostrando-se uma alternativa viável ao controle químico. Os autores afirmam ainda que diversas espécies do gênero *Bacillus* possuem atividade antimicrobiana devido à produção de metabólitos secundários de lipopeptídeos da família iturina (MERCADO-FLORES et al., 2014).

Os produtos à base de alecrim vêm mostrando resultados satisfatórios na literatura para indução de resistência em plantas. Assi et al. (2018) avaliaram o controle de *Alternaria solani* e *Xanthomonas vesicatoria* em tomateiro com pó solúvel de alecrim, obtendo eficiência de até 75% no controle das doenças.

Na cultura da videira, o óleo essencial de alecrim também reduziu a severidade das doenças míldio e mancha foliar. Por meio da atividade das enzimas quitinase e catalase, houve indicação de possível indução de resistência, mostrando-

se uma alternativa para o controle de doenças (MAIA et al., 2014). No milho, estudos com produtos à base de alecrim para induzir resistência ainda são escassos.

Outro fator importante no controle das doenças é a nutrição das plantas, uma vez que os nutrientes exercem funções essenciais no metabolismo vegetal. Os nutrientes podem causar efeito na resistência das plantas através da modificação da anatomia, por meio de células da epiderme mais grossas e lignificadas, e também alterações nas propriedades bioquímicas (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O nitrogênio afeta o desenvolvimento vegetativo, podendo prolongar ou acelerar a maturação das plantas e, conseqüentemente, possibilitar que as plantas fiquem mais suscetíveis ao ataque de patógenos, sendo essa resposta dependente do patossistema (AGRIOS, 2005). Os níveis elevados de nitrogênio podem influenciar na resistência das plantas, pois a alta concentração deste elemento reduz síntese de fitoalexinas e também reduz o teor de lignina nos tecidos vegetais (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 2005).

O cobre exerce funções no metabolismo de compostos secundários, sendo que a deficiência deste elemento desencadeia alterações morfológicas ou bioquímicas que possibilitam a infecção de patógenos (MALAVOLTA, 2006). É um componente que atua em diversos processos metabólicos das plantas, como a respiração e fotossíntese (AMBROSINI et al., 2016).

A maior quantidade de cobre confere menor atividade de peroxidase e catalase, conseqüentemente, maior acúmulo de peróxidos e compostos fenólicos. A alta concentração de cobre pode resultar em maior atividade de polifenoloxidase, responsável pela conversão de quinonas, com característica bactericida, possibilitando a indução de resistência nas plantas (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O cálcio possui diversas funções nos tecidos das plantas, agindo na estabilidade estrutural dos tecidos, permeabilidade e seletividade da membrana e também atuando como mensageiro secundário, ativando proteínas envolvidas nos processos bioquímicos de resistência (ZAMBOLIM; COSTA; VALE, 2005). Este elemento possui um importante papel da indução de resistência, uma vez que o cálcio é um dos componentes para formação de lamela média, com diversos estudos comprovando a redução da incidência e severidade das doenças em plantas como soja, abacate, feijão, tomate e crucíferas (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O baixo conteúdo de cálcio pode aumentar a incidência de doenças, pois poligalacturonatos de cálcio são componentes necessários na lamela média,

possibilitando estabilidade da parede celular. Os patógenos por sua vez, produzem enzimas pectolíticas extracelulares, como a galacturonase, que faz a dissolução da lamela média, logo, altas concentrações de cálcio fortalecem a parede celular (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O fósforo pode aumentar a resistência das plantas, melhorando o equilíbrio dos nutrientes ou também acelerando a maturação dos tecidos vegetais, uma vez que os patógenos tem mais facilidade para infectar tecidos mais jovens (AGRIOS, 2005). Podendo desencadear mudanças bioquímicas, com aumento de peroxidase, polifenóis e amônia, o fósforo produz um ambiente desfavorável para o patógeno (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O potássio contribui para a ativação de enzimas, abertura e fechamento estomático, regulação do potencial osmótico e também atua no processo de absorção iônica. Além disso, o potássio atrasa a maturidade e senescência de algumas culturas, dificultando a infecção de parasitas facultativos (AGRIOS, 2005).

O fosfito de potássio já apresentou atividade antimicrobiana em diversas patossistemas, dentre eles *Fusarium solani* na cultura do maracujá (SOBRINHO et al., 2016); *Phytophthora nicotianae* em citros (REZENDE et al., 2020) e *Mycosphaerella fijiensis* em bananeira (ORTIZ; ZAPATA, 2012).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios foram desenvolvidos no Laboratório de Fitopatologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), *campus* Toledo, e também na casa de vegetação do Campo Experimental de Agronomia, pertencente a mesma instituição, localizada em altitude de 556 metros, com latitude 24°43'13" sul e longitude 53°47'10" oeste.

#### 3.1 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DO ISOLADO

O inóculo foi obtido a partir de folhas de milho que apresentavam lesões características de estria bacteriana, coletadas no município de Palotina (PR). O teste de corrida bacteriana em microscópio foi realizado para confirmar a presença de bactéria no tecido lesionado.

O isolamento indireto do patógeno foi realizado conforme metodologia de Mafia, Alfenas e Gonçalves (2016), com assepsia superficial do tecido vegetal em etanol 70% e hipoclorito de sódio 1%, e posterior trituração em solução salina (NaCl 0,85%) estéril. Em seguida, uma alíquota da suspensão foi transferida por estrias compostas para placa de Petri com meio de cultura ágar-nutriente. As placas foram armazenadas em estufa por 72 horas a 25 °C ± 2 °C e escuro. Após o crescimento, uma colônia que estava isolada foi transferida para um microtubo contendo solução salina (NaCl 0,85%) estéril, e após a homogeneização, foram feitas estrias simples em placas de Petri com ágar-nutriente, mantendo-as por 72 horas a 25 °C ± 2 °C e escuro.

Em seguida foi realizada a inoculação da bactéria em plantas de milho sadias, sendo verificado a reprodução dos sintomas da doença, seguido do re-isolamento de *X. vasicola* pv. *vasculorum*, com o intuito de completar os Postulados de Koch (REZENDE; MASSOLA JÚNIOR; BEDENDO, 2018). Além disso, foi realizado o diagnóstico molecular por PCR-RFLP do gene *rpoB* para confirmar a identidade do patógeno, utilizando-se as enzimas *Hae* III e *Hpa* II; marcador de peso molecular de 1 Kb; *X. albilineans*; *X. sacchari*; *X. axonopodis* pv. *vasculorum*; *X. vasicola* pv. *holcicola* e *X. vasicola* pv. *vasculorum*.

A bactéria foi preservada em microtubos com capacidade de 2 mL, contendo 1,5 mL de solução salina (NaCl 0,85%) estéril, sendo armazenados a 10 °C em

refrigerador (GONÇALVES; ALFENAS; MAFIA, 2016). Para a recuperação de *X. vasicola* pv. *vasculorum* para montagem dos experimentos, uma alçada de suspensão bacteriana era transferida em placas de Petri contendo meio ágar-nutriente e mantida por 72 horas a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e escuro.

### 3.2 CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA

A curva padrão bacteriana foi obtida para determinar a concentração da suspensão bacteriana do inóculo, a partir da adaptação da metodologia de Kuhn et al. (2006) e Mariano e Assis (2000), através da contagem de colônias em placas de Petri.

A suspensão bacteriana foi preparada em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e ajustada para realização das leituras por espectrofotometria a 580 nm, nas absorbâncias de 1,8; 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2. A partir destes, foram realizadas diluições em série com 100  $\mu\text{L}$  da suspensão obtida + 900  $\mu\text{L}$  da solução salina estéril 0,85% NaCl, estendendo-se até a concentração  $10^{-8}$ . Uma alíquota de 10  $\mu\text{L}$  das diluições correspondentes à  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  e  $10^{-8}$  foi pipetada em placas de Petri contendo meio de cultura ágar-nutriente, com seis repetições. As placas foram mantidas em BOD a  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e escuro.

O cálculo da concentração da suspensão foi realizado através da contagem direta do número de unidades formadoras de colônia (UFC) após 24 horas, sendo considerado o fator de diluição de cada amostra. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 1.

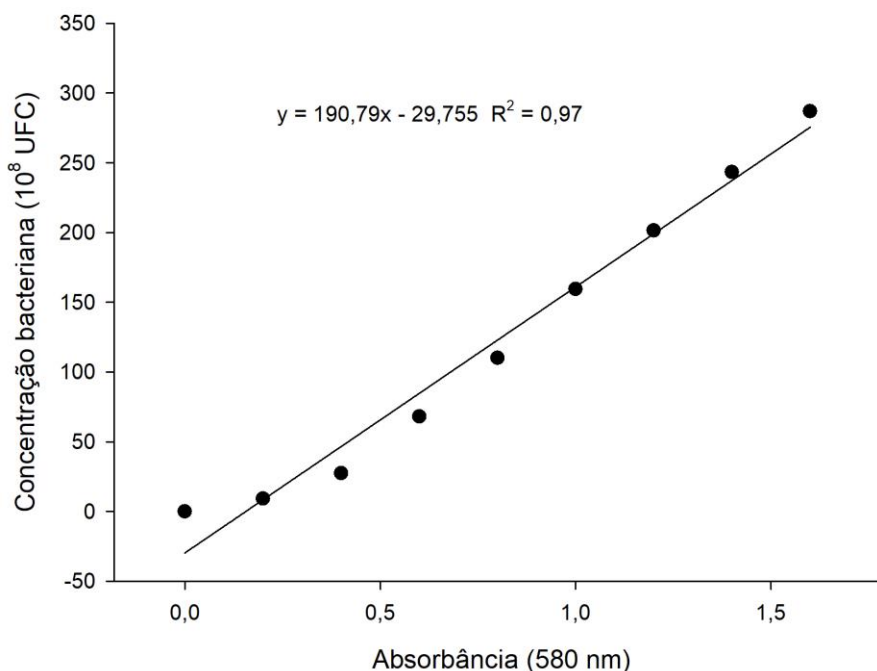


Figura 1 - Curva de concentração bacteriana de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, baseada em unidades formadoras de colônia e absorvância a 580 nm.

### 3.3 EXPERIMENTO *IN VIVO* – MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

Para o experimento de métodos de inoculação foi utilizado delineamento blocos casualizados com cinco repetições. Os métodos de inoculação foram: por aspersão; via hidatódios; ferimentos no colmo; ferimentos na folha e deposição de inóculo no cartucho, além de uma testemunha não inoculada. A suspensão de inóculo foi calibrada para  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)  $\text{mL}^{-1}$ .

O híbrido P4285 VYHR foi semeado em vasos de polietileno com capacidade de 5 litros, contendo solo (latossolo vermelho eutroférico) e areia na proporção 1:1 (v:v). Os tratamentos foram realizados quando as plantas atingiram o estágio fenológico V4. Os experimentos foram conduzidos duas vezes, nos meses de setembro e novembro de 2020 em casa de vegetação.

A inoculação por aspersão foi direcionada na terceira folha da planta com auxílio de borrifador. A inoculação via hidatódios aconteceu com um cotonete imerso na suspensão e passado pelos bordos da terceira folha expandida. O tratamento com o ferimento no colmo foi realizado com um palito submerso na suspensão do inóculo e introduzido no ponto de inserção da terceira folha. Para o ferimento na folha, foi utilizado pinça histológica previamente imersa na suspensão e pressionada no meio



da terceira folha expandida, e localizada próxima a nervura principal. Para inoculação no cartucho, 1 mL da suspensão de inóculo foi depositado com micropipeta.

A severidade da doença foi avaliada com escala diagramática proposta por Braga et al. (2020), iniciada ao sétimo dia após a inoculação (momento do surgimento dos sintomas), totalizando quatro avaliações com intervalo de dois dias. A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi calculada pelo método da integração trapezoidal (SHANER; FINNEY, 1977), com base na severidade média da doença por planta, o número de avaliações e o intervalo entre duas avaliações, por meio da fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=0}^n \left( \frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) (X_{i+1} - X_i)$$

Onde, n = número de observações;  $Y_i$  = severidade da doença na “i”-ésima observação;  $X_i$  = tempo em dias na “i”-ésima observação.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, foram comparados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

### 3.4 EXPERIMENTO *IN VIVO* – QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO

O delineamento experimental adotado foi blocos casualizados, com cinco repetições e cinco tratamentos: 0,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os experimentos foram conduzidos duas vezes, em janeiro e fevereiro de 2021 em casa de vegetação.

Sementes do híbrido P4285 VYHR foram semeadas em vasos de polietileno com 5 litros de capacidade, contendo solo (latossolo vermelho eutroférico) e areia na proporção 1:1 (v:v). Ao atingir o estágio fenológico V4, as bactérias foram inoculadas conforme o melhor método de inoculação do experimento anterior (por aspersão). As avaliações de severidade e área abaixo da curva de progresso da doença foram feitas conforme o experimento de métodos de inoculação (item 3.3).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e quando significativos submetidos à análise de regressão com 5% de probabilidade de erro com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

### 3.5 EXPERIMENTO *IN VITRO* – SENSIBILIDADE À PRODUTOS

O experimento de sensibilidade *in vitro* de *X. vasicola* pv. *vasculorum* foi implantado com delineamento inteiramente casualizado com cinco repetições. Os produtos utilizados e suas características estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Nome comercial, classe e ingrediente ativo/composição dos produtos utilizados para avaliar a sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*.

Nome comercial	Classe	Ingrediente ativo/Composição
All Crim®	Fertilizante mineral misto	Nitrogênio (1%), Cobre (5%) e Cálcio (29%) + pó solúvel de alecrim
Bion®	Fungicida	Acibenzolar-S-metílico (ASM)
Curative®	Fertilizante mineral misto	Fósforo (40%), Fosfito de Potássio (25%), Magnésio (2,5%), Enxofre (3,5%), Cobre (1%) e Níquel (0,5%)
Óleo essencial de melaleuca	Óleo essencial	Terpinen-4-ol (40%) e 1,8-cineole (6,3%)
Serenade®	Fungicida/bactericida microbiológico	<i>Bacillus subtilis</i>
Status®	Fungicida/bactericida	Oxicloreto de cobre (58,8%)
Stop®	Fertilizante foliar	Potássio (1,23%) e Cobre (1,23%)

A dosagem inicial de cada produto foi baseada de acordo com a recomendação do fabricante para a cultura do milho ou recomendação para controle de patógenos do gênero *Xanthomonas*, adotando-se: All Crim® (5 g L<sup>-1</sup>), Bion® (0,2 g L<sup>-1</sup>), Curative® (7,5 g L<sup>-1</sup>), Serenade® (36,3 mL L<sup>-1</sup>), Status® (2 mL L<sup>-1</sup>) e Stop® (5 mL L<sup>-1</sup>). A dose inicial do óleo essencial de melaleuca (2 mL L<sup>-1</sup>) foi baseada em estudo proposto por Hendges et al. (2021), ao avaliar o seu efeito no controle de doença em plantas.

A partir desta dose inicial descrita acima foi implantado o experimento *in vitro* com as doses correspondentes a 0,5, 1, 1,5, 2, 3, 4, 5 e 6 vezes, conforme detalhado na Tabela 2. Para controle negativo foi utilizado água (testemunha) e para controle positivo foi utilizado o Pentabiótico® (Benzilpenicilina benzatina, Benzilpenicilina procaína, Benzilpenicilina potássica, Diidroestreptomicina base (sulfato) e

Estreptomicina base (sulfato)) na dose de 1,5 g L<sup>-1</sup> de água. Em todos os tratamentos foi adicionado espalhante adesivo (Tween 20) a 0,5%.

Tabela 2 - Doses dos produtos utilizados para avaliar a sensibilidade *in vitro* de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* para 100 mL de água.

Nome comercial	Dose 0,5x	Dose 1x	Dose 1,5x	Dose 2x	Dose 3x	Dose 4x	Dose 5x	Dose 6x
All Crim® (g)	0,25	0,5	0,75	1	1,5	2	2,5	3
Bion® (g)	0,01	0,02	0,03	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12
Curative® (g)	0,375	0,75	1,125	1,5	2,25	3	3,75	4,5
Óleo essencial de melaleuca (µL)	100	200	300	400	600	800	1000	1200
Serenade® (µL)	1815	3630	5445	7260	10890	14520	18150	21780
Status® (µL)	100	200	300	400	600	800	1000	1200
Stop® (µL)	250	500	750	1000	1500	2000	2500	3000

O meio de cultura ágar-nutriente foi vertido em placas de Petri e após a solidificação foi adicionado 100 uL de suspensão bacteriana, espalhada com alça de drigalski. Discos de papel de 6 mm submersos na solução dos tratamentos, foram dispostos em cada placa. Cada placa foi composta por um disco testemunha, um disco com bactericida e outros quatro discos de papel, cada um deles com uma dose de um produto. As placas foram armazenadas em BOD a 25 °C ± 2 °C e escuro. Após 24 horas foi verificada a presença e ausência de halo inibitório e em casos de presença do halo foi realizada a medição com paquímetro.

Os ensaios para cada produto foram conduzidos individualmente. Os tratamentos (produtos utilizados) foram submetidos a análise de variância e quando significativos, foram analisados pelo teste de regressão ao nível de 5% de probabilidade de erro, com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011), com a finalidade de se obter o ponto de máxima inibição de cada produto avaliado no intervalo das doses analisadas.

### 3.6 EXPERIMENTO *IN VIVO* – CONTROLE DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação com delineamento blocos casualizados, em esquema fatorial 8x2 (oito produtos: testemunha, All Crim®, Bion®, Curative®, óleo essencial de melaleuca, Serenade®, Status® e Stop®, e duas coletas: terceira e quarta folha de milho) e cinco repetições. A partir dos resultados do ensaio *in vitro* (item 3.5) determinou-se a dosagem de cada produto para implantação do ensaio *in vivo*.

Os tratamentos utilizados foram compostos por: testemunha, All Crim® (5 g L<sup>-1</sup>), Bion® (0,2 g L<sup>-1</sup>), Curative® (7,5 g L<sup>-1</sup>), óleo essencial de melaleuca (8,16 mL L<sup>-1</sup>), Serenade® (146,08 mL L<sup>-1</sup>), Status® (7,4 mL L<sup>-1</sup>) e Stop® (24,5 mL L<sup>-1</sup>). Em todos os tratamentos foi adicionado Tween 20 com a finalidade de maior aderência do produto nas folhas de milho, e também a homogeneização do óleo essencial com a água. Os experimentos foram realizados nos meses de maio e junho de 2021.

As sementes de milho P4285 VYHR foram semeadas em vasos de polietileno de 5 litros, contendo solo (latossolo vermelho eutroférico) e areia na proporção 1:1 (v:v). Ao atingir o estágio fenológico V4, a terceira folha expandida foi submetida ao tratamento por meio de aspersão localizada. Após 72 horas, a terceira folha (tratada) e quarta folha (não tratada) receberam o inóculo de *X. vasicola* pv. *vasculorum* (1x10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>) com auxílio de borrifador e envolvida por sacos plásticos por 15 horas com finalidade de promover uma câmara úmida.

Com o surgimento dos sintomas aos 11 dias após a inoculação iniciou-se a avaliação de severidade da estria bacteriana com auxílio de escala diagramática (BRAGA et al., 2020). Foram realizadas cinco avaliações com intervalo de dois dias cada. O cálculo da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) foi realizada com auxílio da metodologia de Shaner e Finney (1977), por meio da fórmula:

$$AACPD = \sum_{i=0}^n \left( \frac{Y_{i+n1} + Y_i}{2} \right) (X_{i+1} - X_i)$$

Onde, n = número de observações; Y<sub>i</sub> = severidade da doença na “i”-ésima observação; X<sub>i</sub> = tempo em dias na “i”-ésima observação.

Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância e posteriormente, quando significativos, foram analisados pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro, através do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

### 3.7 ANÁLISE BIOQUÍMICA

A análise bioquímica foi realizada com os produtos que apresentaram resultados significativos de controle de acordo com o experimento anterior (item 3.6). Os tratamentos implantados para avaliação enzimática foram: testemunha, All Crim®, Bion® e Curative®. O delineamento blocos casualizados foi conduzido em esquema fatorial 4x7 (quatro produtos: All Crim®, Curative®, Bion® e testemunha, e sete tempos de coleta: 0, 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas), com três repetições, sendo cada planta correspondente a uma repetição.

### **3.7.1 Obtenção do tecido foliar e extrato enzimático**

As sementes do híbrido P4285 VYHR foram semeadas em vasos de 5 litros contendo solo (latossolo vermelho eutroférico) e areia na proporção 1:1 (v:v). Ao atingir o estágio fenológico V4, o tratamento foi aplicado na terceira folha expandida e após 72 horas a suspensão de inóculo foi aplicada nas terceira e quarta folhas, em seguida, as plantas foram mantidas em câmara úmida por 15 horas com auxílio de sacos plásticos.

A coleta das folhas de milho foi realizada no intervalo de 0 h (momento do tratamento), 24 h, 48 h, 72 h (momento da inoculação), 96 h, 120 h e 144 h após os tratamentos. As coletas também foram realizadas em plantas não tratadas e que foram apenas inoculadas com o patógeno. As amostras foliares tiveram a nervura central destacada logo após a coleta, em seguida acondicionada em envelopes de papel alumínio e congelada a -20 °C para posterior análise bioquímica.

O material foliar foi homogeneizado em 8 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) e 0,02 g de polivinilpirrolidona (PVP) em tubos FastPrep de 15 mL contendo uma esfera de zircônia de 6 mm. Os tubos foram acondicionados no homogeneizador de amostras (Modelo FastPrep-24TM 5G, MP Biomedicals) para o processamento, sob velocidade calibrada (6,0 m s<sup>-1</sup>), em um ciclo de 100 segundos de duração.

O homogeneizado foi centrifugado a 20000g durante 25 min a 4 °C (STANGARLIN; PASCHOLATI; FRANZENER, 2005). O sobrenadante obtido, considerado como extrato enzimático, foi transferido para microtubos e armazenado a -20 °C. Posteriormente foi realizada a determinação do teor de proteínas e atividade das enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase.

### 3.7.2 Teor de proteínas

O teor de proteínas das amostras foi determinado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). A composição da reação consistiu em 800  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático, previamente diluído em tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0), para teor de proteína solúvel entre 1 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , conforme a sensibilidade do método, e 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. O branco consistiu 800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,01 M (pH 6,0) e 200  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. Após a mistura do extrato enzimático e do tampão fosfato foi adicionado o reagente sob agitação. As amostras foram incubadas por 5 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro à 595 nm, em triplicata.

### 3.7.3 Atividade de peroxidase

A atividade de peroxidase foi determinada pelo método espectrofotométrico direto, através da medida da conversão do guaiacol em tetraguaiacol. A reação foi realizada com 20  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático (refrigerado a 4 °C) misturado com 980  $\mu\text{L}$  de uma solução composta por 12,5 mL de guaiacol 2% e 306  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio em 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) (banho maria a 30 °C por 30 minutos), em duplicata. O branco foi composto por 1000  $\mu\text{L}$  da solução. Foram realizadas as leituras a 470 nm durante 2 minutos, com intervalos de 15 segundos, sendo expressos os resultados em unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$  (HAMMERSCHMIDT; NUCLES; KUĆ, 1982).

### 3.7.4 Atividade de polifenoloxidase

A atividade de polifenoloxidase (PFO) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Duangmal e Apenten (1999), pela mensuração da conversão do catecol em quinona. A solução utilizada foi composta por 0,11 g de catecol dissolvido em tampão fosfato de sódio 0,01 M (pH 6,0) em banho maria a 30 °C por 30 minutos. A reação ocorreu com a mistura de 100  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático e 900  $\mu\text{L}$  da solução citada acima, em duplicata. O branco foi considerado 1000  $\mu\text{L}$  da solução. As leituras foram realizadas a cada 15 segundos a 420 nm em espectrofotômetro, durante 2 minutos. Os resultados foram expressos em unidades de absorvância  $\text{min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ .

### 3.7.5 Atividade de fenilalanina amônia-liase

A atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) foi determinada pela quantificação colorimétrica do ácido *trans*-cinâmico liberado do substrato fenilalanina (UMESHA, 2006). A reação continha 50 µL do extrato proteico misturado com 450 µL do tampão Tris HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina (0,8255 g de L-fenilalanina em 100 mL de tampão Tris HCl 0,025 M com pH 8,8), incubada por 2 horas em banho maria a 40 °C. O controle foi composto por 50 µL do extrato proteico e 950 µL do tampão Tris HCl 0,025 M (pH 8,8). O branco foi composto por 500 µL do tampão Tris HCl 0,025 M (pH 8,8) e 500 µL de L-fenilalanina. Após o tempo de incubação, foi adicionado 60 µL de HCl 5 M com finalidade de cessar a reação. A absorbância das amostras foi determinada a 290 nm. A atividade enzimática foi expressa em µg ácido *trans*-cinâmico min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup>, utilizando curva padrão para o ácido.

### 3.7.6 Análise estatística

Os dados enzimáticos foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias foram analisadas pelo teste de Tukey a 5%, com auxílio do software estatístico Sisvar (FERREIRA, 2011).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 EXPERIMENTO *IN VIVO* – MÉTODOS DE INOCULAÇÃO

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho inoculadas com *X. vasicola* pv. *vasculorum* por diferentes métodos apresentou significância a 5% de probabilidade de erro para as duas épocas de implantação do experimento (Figura 2).

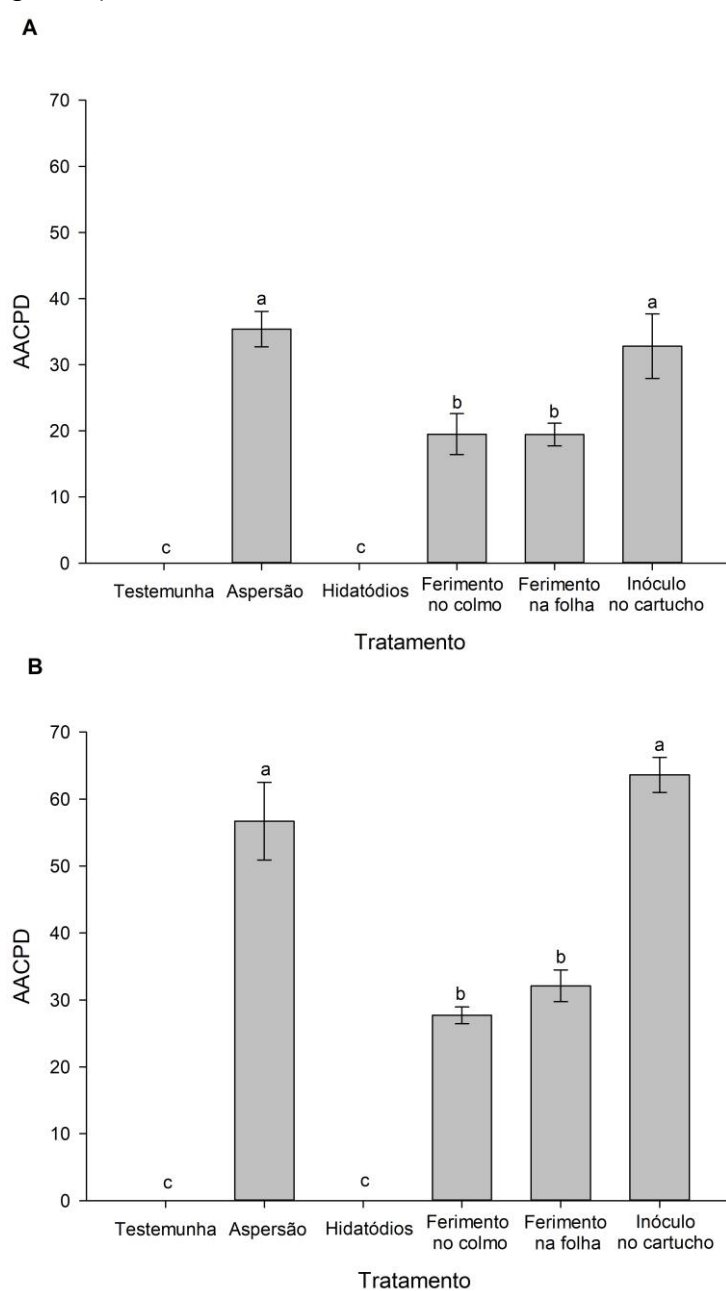


Figura 2 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho em função de métodos de inoculação com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Toledo (PR), setembro de 2020 (A) e novembro de 2020 (B). Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância.



Os métodos de inoculação por aspersão e deposição de inóculo no cartucho apresentaram comportamento semelhante em ambas as épocas, resultando em maiores valores de severidade em relação aos demais. Em sequência, os métodos por ferimentos na folha e no colmo apresentaram AACPD intermediária, assemelhando-se entre si estatisticamente. Os tratamentos de testemunha (plantas não inoculadas) e inoculação via hidatódios não apresentaram sintomas durante a condução dos experimentos.

No experimento implantado em setembro de 2020 (Figura 2A), a inoculação por aspersão apresentou AACPD com valor de 35,4 e a inoculação com deposição de inóculo no cartucho teve valor de 32,8. *X. vasicola* pv. *vasculorum* quando inoculada por ferimentos no colmo e na folha apresentou AACPD igual a 19,5 e 19,44, respectivamente.

Os valores obtidos no experimento em novembro de 2020 (Figura 2B) apresentaram AACPD de 56,7 e 63,6 para os métodos de inoculação por aspersão e deposição de inóculo no cartucho, respectivamente. Para o método com ferimentos no colmo a AACPD correspondeu a 27,7 e o método com ferimentos na folha resultou em valor de 32,1.

Os métodos de inoculação por aspersão e deposição de inóculo no cartucho provavelmente possibilitaram o maior número de células bacterianas em contato com a superfície foliar. Estas células, quando envoltas por um filme de água, penetraram no hospedeiro pelos estômatos abertos, resultando conseqüentemente em maior AACPD. Em estudo sobre a associação de fatores agronômicos e estria bacteriana em milho, Hartman et al. (2020a) constataram que a alta umidade relativa do ar é um importante fator que favorece *X. vasicola* pv. *vasculorum*, conseqüentemente o desenvolvimento da doença nas folhas.

Por outro lado, a inoculação por ferimentos proporciona menor vulnerabilidade em relação às variações ambientais no momento da penetração do patógeno, uma vez que por este método a bactéria não necessita de molhamento foliar (AMORIM; PASCHOLATI, 2018). Lang et al. (2017), ao estudarem a detecção e caracterização de *X. vasicola* pv. *vasculorum*, inocularam o patógeno por meio de corte de folhas de milho, sorgo e cana-de-açúcar e verificaram a presença de exsudato bacteriano, corroborando com o presente estudo, onde as plantas de milho inoculadas pelo método de ferimento também apresentaram sintomas da doença.

A penetração do patógeno via hidatódios é relatada em algumas relações patógeno-hospedeiro, como *X. campestris* pv. *campestris* em crucíferas (VICENTE; HOLUB, 2013); *X. oryzae* pv. *oryzae* em arroz (MEW; MEW; HUANG, 1984) e *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* em cafeeiro (SOUZA et al., 2019). Porém, esse método de inoculação não se mostrou eficiente para causar sintomas de estria bacteriana no milho, uma vez que para ocorrer a penetração via hidatódios é necessária a reabsorção de água para o interior dos vasos do xilema da planta (AMORIM; PASCHOLATI, 2018).

A entrada do patógeno também foi observada por Mew, Mew e Huang (1984), onde os autores descobriram que a bactéria *X. oryzae* pv. *oryzae* penetrou nas folhas de arroz via hidatódios, porém, quando uma interação incompatível foi apresentada, a população do patógeno foi reduzida. Assim, o modo de entrada das bactérias através dos hidatódios depende de uma combinação de fatores ambientais, biológicos e mecânicos (MEIER, 1934).

Ferreira e Tebaldi (2019), ao estudarem os métodos de inoculação de *X. campestris* pv. *passiflorae* em maracujazeiro, recomendaram o método por aspersão para os programas de melhoramento genético da cultura visando resistência a este patógeno. Desta maneira, afirma-se que a aspersão é eficiente na inoculação de bactérias do gênero *Xanthomonas*.

A ocorrência de sintomas de doenças originadas por bactérias do gênero *Xanthomonas* também é verificado com os métodos de inoculação com ferimentos com agulha ou pinça, incisão com tesoura e fricção com gaze umedecido, nas plantas de limão cravo, feijão, uva e maracujá (BELASQUE JÚNIOR; JESUS JÚNIOR, 2006; FERREIRA; TEBALDI, 2019; NASCIMENTO et al., 2006; SILVA et al., 2009).

#### 4.2 EXPERIMENTO *IN VIVO* – QUANTIFICAÇÃO DO INÓCULO

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) apresentou diferença significativa ao nível de 5% de probabilidade de erro, ocorrendo efeito quadrático para as concentrações de *X. vasicola* pv. *vasculorum* para ambos os períodos de implantação do experimento (Figura 3).

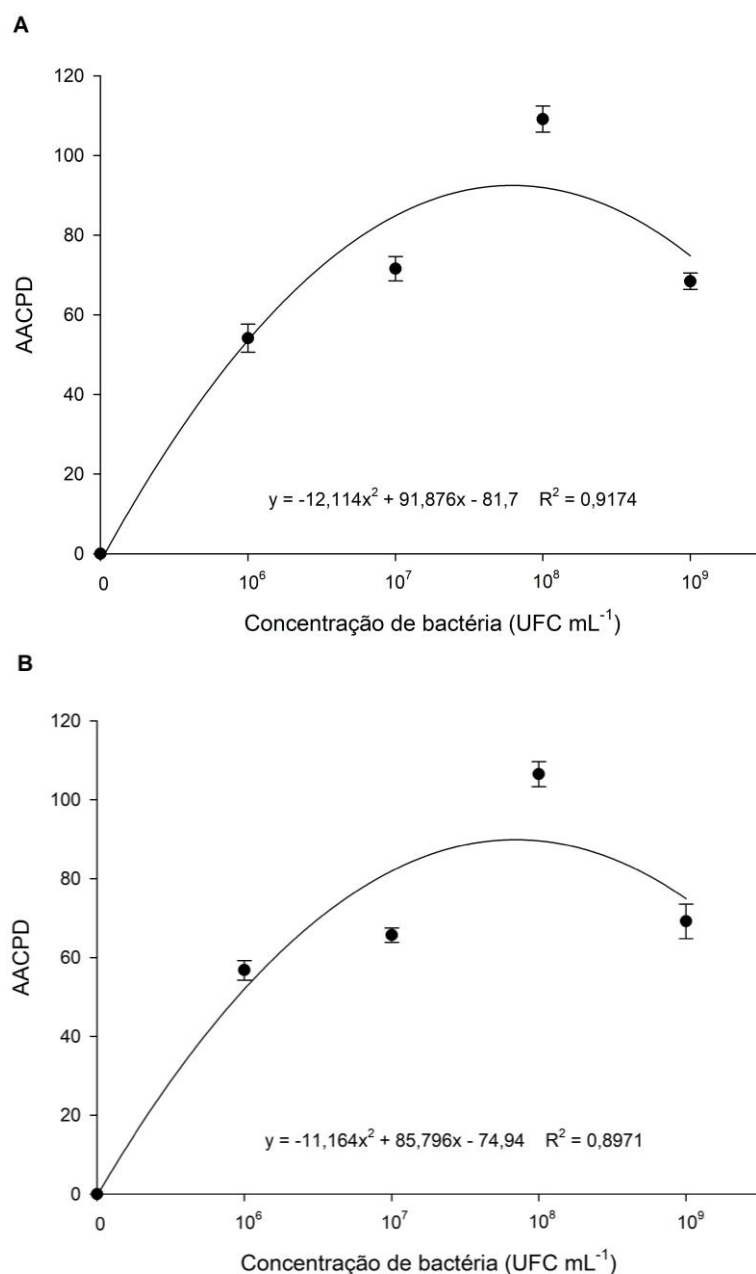


Figura 3 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho inoculadas com concentrações de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Toledo (PR), janeiro de 2021 (A) e fevereiro de 2021 (B).

A máxima AACPD para o experimento de janeiro de 2021 (Figura 3A) correspondeu a 91,5 na concentração  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, com as demais concentrações apresentando valores menores, como 53,48; 84,63 e 74,08 para as concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente. Para o experimento de fevereiro de 2021 (Figura 3B) o comportamento é semelhante, sendo a máxima AACPD (89,62) verificada na concentração de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, e os valores de 51,99; 81,97 e 74,94 para as concentrações  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> respectivamente.

Rodrigues, Bueno e Tebaldi (2016), estudando duas concentrações de inóculo de *Xanthomonas* sp., constataram que a AACPD da mancha bacteriana do tomateiro na concentração  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> foi maior estatisticamente em relação à concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Resultados estes também observados no presente estudo, onde é possível constatar um incremento da AACPD da concentração  $10^6$  para  $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, equivalente a 38,5% e 44,14% nos experimentos realizados em janeiro e fevereiro, respectivamente.

Belasque Júnior e Jesus Júnior (2006) estudaram a indução de sintomas de cancro cítrico em plantas de limão com concentrações do inóculo de *X. axonopodis* pv. *citri* constituídas por  $10^6$ ,  $10^7$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os autores observaram que as concentrações do inóculo equivalente a  $10^7$  e  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> resultaram infecções mais severas quando comparadas a concentração de  $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

A concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* em meloeiro foi avaliado por Silveira, Michereff e Mariano (2003), variando entre  $3,4 \times 10^1$  a  $3,4 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Os autores consideraram a concentração de  $3,4 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> a mais indicada para inoculação desta bactéria a fim de estudar alternativas para o controle da mancha-aquosa em meloeiro.

#### 4.3 EXPERIMENTO *IN VITRO* – SENSIBILIDADE À PRODUTOS

Os resultados obtidos com os produtos após a realização do ensaio *in vitro* demonstraram que houve formação de halo inibitório de *X. vasicola* pv. *vasculorum* para os tratamentos com Stop®, a partir da dose 3x em referência a dose inicial, e com Status®, óleo essencial de melaleuca e Serenade® em todas as doses avaliadas. Os produtos All Crim®, Curative® e Bion® não proporcionaram halos de inibição de nenhuma das doses testadas, logo, não houve atividade antimicrobiana. A testemunha não apresentou formação de halo e o Pentabiótico® por sua vez proporcionou halo de inibição em todas as placas de Petri (Tabela 3).

Tabela 3 - Formação de halo de inibição do crescimento bacteriano *in vitro* de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* para as doses 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6x dos produtos All Crim®, Curative®, Bion®, Stop®, Status®, óleo essencial de melaleuca e Serenade®.

PRODUTOS	Pentabiótico®	Testemunha	Doses								
			0,5	1	1,5	2	3	4	5	6	
All Crim®	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Curative®	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bion®	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stop®	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
Status®	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Óleo essencial	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Serenade®	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Notas: (-) sem formação de halo de inibição; (+) houve formação de halo de inibição.

A atividade *in vitro* antimicrobiana do All Crim® foi avaliada por Mata et al. (2021) contra *X. campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae* ambos isolados de couve folha. Os autores observaram a redução significativa da bactéria com concentrações de 4% e 6%, correspondentes a 61,8% e 74,5%, respectivamente. Em relação ao fungo, o formulado composto por nitrogênio, cálcio e cobre apresentou máxima inibição com a concentração de 5,31%, observando um comportamento dose-dependente.

O extrato aquoso de alecrim em concentração de 20% e mais 12 espécies de plantas medicinais foram estudados por Soltani e Aliabadi (2013), com a finalidade de verificar a atividade antibacteriana sobre *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis*, agente causal do cretamento bacteriano em noqueira. Os autores concluíram que o extrato de alecrim possui potencial significativo para inibir o crescimento do patógeno *in vitro*.

Por outro lado, o estudo com óleo essencial de alecrim na concentração de 1% não apresentou atividade antibacteriana sobre as *X. translucens* e *X. arboricola* (MAČIONIENĖ et al., 2022). Desta maneira, os resultados confirmam que a atividade antibacteriana *in vitro* é dependente da espécie do microrganismo em análise, do modo de ação dos compostos em estudo e também da concentração dos formulados.

O crescimento de *X. vasicola* pv. *vasculorum* não foi interferido pela ação do Curative®, não apresentando halo de inibição do patógeno para nenhuma dose

avaliada (0,375 a 4,5%), embora este produto contenha em sua formulação fosfito de potássio e cobre, que podem atuar diretamente sobre os patógenos.

Os fosfitos têm sido amplamente estudados em diversos patossistemas. Abreu, Martins e Miranda (2021) observaram redução do crescimento micelial de *Didymella bryoniae* a partir da concentração de 10% do produto. O fosfito de potássio a 15% de concentração, proporcionou 94% de diminuição do crescimento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieiras (ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010).

Por outro lado, Zacaroni (2008) não observou o efeito do fosfito de potássio no crescimento de *X. axonopodis* pv. *malvacearum* em algodoeiro e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijoeiro, com a concentração de 0,5%. Esses dados comprovam que a variação entre os patossistemas e as concentrações interferem diretamente nos resultados do desenvolvimento do patógeno *in vitro*.

De acordo com Santos et al. (2010), o crescimento *in vitro* de *X. campestris* pv. *viticola* não sofreu inibição com indutores de resistência contendo cobre. Os autores não observaram efeito sobre o crescimento do patógeno, corroborando desta maneira com os resultados do presente estudo.

Acibenzolar-S-metil não apresentou halo de inibição sobre o crescimento do patógeno *X. campestris* pv. *sesami* causadora de mancha bacteriana em gergelim (MORINIGO; OCAMPOS, 2013). Em outros estudos desenvolvidos com ASM também não foram observadas atividade antimicrobiana, dentre eles as relações patógeno-hospedeiro *Rhizoctonia solani* em arroz (SCHURT et al., 2013), *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em feijão (TOILLIER et al., 2010) e *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* em couve chinesa (MELLO et al., 2017), corroborando com os resultados do presente estudo.

A atividade antimicrobiana direta sobre o patógeno não é evidenciada com o uso de ASM, fator característico dos indutores de resistência, logo, permanece como uma opção adicional para o controle das doenças no campo (KESSMANN et al., 1994; SILVA JUNIOR; BEHLAU, 2018).

O tamanho dos halos inibitórios apresentou comportamento cúbico para o tratamento com Stop® e efeito quadrático para os tratamentos com Status®, óleo essencial de melaleuca e Serenade® (Figura 4).

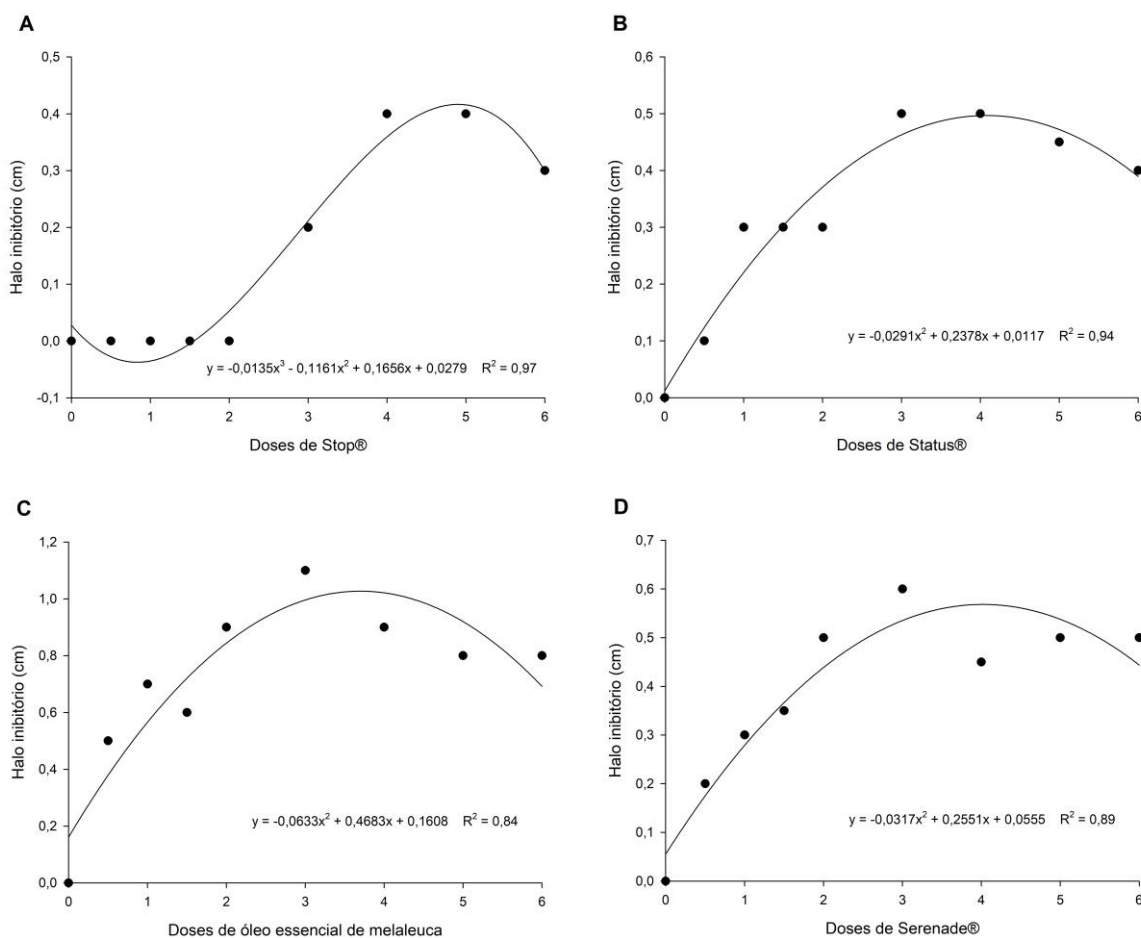


Figura 4 - Halo inibitório (cm) de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* na presença das doses 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 e 6x dos produtos Stop® (A), Status® (B), óleo essencial de melaleuca (C) e Serenade® (D).

O produto Stop®, composto por potássio e cobre, apresentou 0,42 cm de inibição para *X. vasicola* pv. *vasculorum* com a dose correspondente a 24,5 mL L<sup>-1</sup> (4,9x a dose inicial), sendo este o ponto de máxima inibição conforme a equação (Figura 4A). O cobre e potássio são elementos que podem interferir na ação dos patógenos.

De acordo com Graham e Webb (1991), o cobre pode apresentar efeito direto ao patógeno, uma vez que este micronutriente é pouco requerido pelos microrganismos em comparação às plantas, e também os patógenos são pouco tolerantes ao excesso de cobre. Vincent; Hartemann; Engels-Deutsch (2016) afirmam que a maior eficiência e rapidez da ação antimicrobiana está diretamente correlacionada com a maior concentração do cobre, presente na composição de um produto.

Status®, princípio ativo oxiclureto de cobre, apresentou halo de inibição máximo com 0,50 cm com uma dose de 8,7 mL L<sup>-1</sup> (4,08x a dose inicial), baseado na equação (Figura 4B), ocasionando em uma ação tóxica direta ao patógeno. Nesta linha, Santos et al. (2017) observaram a redução do crescimento micelial de *Cercospora beticola* de acordo com o aumento da concentração do oxiclureto de cobre.

De acordo com Marques; Uesugi e Ferreira (2009), houve variações na sensibilidade de *X. campestris* pv. *viticola* aos produtos à base de cobre, sendo que algumas estirpes se apresentaram mais tolerantes naturalmente. Desta maneira, afirma-se que o cobre possui atividade antimicrobiana direta sobre os patógenos com diferentes intensidades, variando conforme a concentração do produto e do gênero ou espécie do patógeno.

O óleo essencial de melaleuca proporcionou a máxima inibição (1,03 cm) de *X. vasicola* pv. *vasculorum* com a dose 7,4 mL L<sup>-1</sup> (3,7x a dose inicial) de acordo com a equação (Figura 4C). Esses dados confirmam a ação antimicrobiana do óleo, assim como foi observado por Souza et al. (2015) avaliando a inibição de *Cercospora beticola* em beterraba, *Alternaria solani* em tomateiro (HENDGES et al., 2021), *X. oryzae* pv. *oryzae* em arroz (VISHAKHA et al., 2022) e *X. vesicatoria* em tomateiro (LUCAS et al., 2012).

Serenade®, composto por *Bacillus subtilis*, apresentou máxima inibição (0,57 cm) do crescimento bacteriano de *X. vasicola* pv. *vasculorum* na dose correspondente a 4,02x a dose inicial do produto, igual a 146,06 mL L<sup>-1</sup> (Figura 4D), de acordo com a estimativa da equação. O gênero *Bacillus* spp. atua como um agente de controle por apresentar multiplicidade de mecanismos antagonísticos, como a síntese de substâncias antimicrobianas, possibilitando uma ampla gama de mecanismos de ação para driblar as defesas dos fitopatógenos (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

A atividade antagonista de *Bacillus subtilis* também foi observada por Shiomi; Melo e Minhoni (2008) contra os patógenos *Fusarium moniliforme*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* e *Exserohilum turcicum*, que causam doenças no milho. Os autores observaram taxas de inibição do crescimento micelial dos fitopatógenos entre 42,8% e 53,8%, ocasionado pela ação de *B. subtilis*. No mesmo estudo, os autores também constataram atividade inibitória exercida por *Bacillus lentimorbus*, confirmando o potencial antimicrobiano do gênero *Bacillus* spp.



#### 4.4 EXPERIMENTO *IN VIVO* – CONTROLE DA ESTRIA BACTERIANA DO MILHO

A área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) apresentou diferença significativa a 5% de probabilidade de erro nas folhas de milho tratadas com os produtos e inoculadas com *X. vasicola* pv. *vasculorum*, em ambas as épocas de condução dos experimentos, para a terceira folha (tratada e inoculada) e para a quarta folha de milho (somente inoculada com o patógeno) (Figura 5).

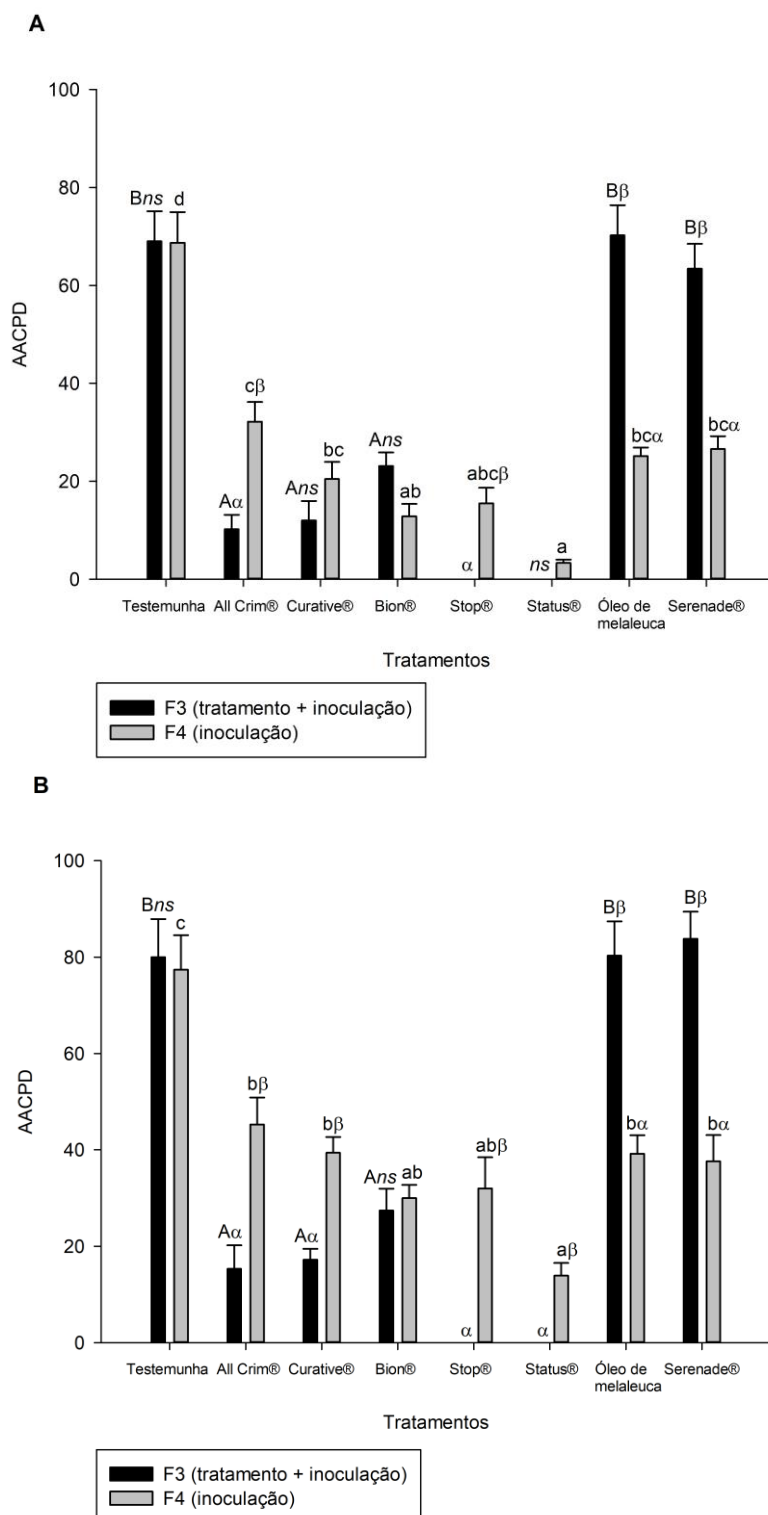


Figura 5 - Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas de milho tratada (F3) e não tratada (F4) com All Crim®, Curative®, Bion®, Stop®, Status®, óleo essencial de melaleuca, Serenade® e testemunha, e inoculadas com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Toledo (PR), maio de 2021 (A) e junho de 2021 (B). Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras maiúsculas para comparação dos tratamentos na terceira folha; letras minúsculas para comparação dos tratamentos na quarta folha; letras gregas para comparação entre a terceira e quarta folha de cada tratamento); ns: não significativo.

Os produtos Stop® e Status® apresentaram fitotoxidade nas folhas de milho tratadas em ambas as épocas de avaliação, sendo assim, não foi possível avaliar a severidade da doença nestes tratamentos. O efeito tóxico destes produtos, com cobre em sua composição, iniciou com o escurecimento do limbo foliar e em seguida progrediu ocorrendo a queima das folhas.

A fitotoxidade em folhas de milho foi observado por Duin et al. (2022) ao avaliarem o controle de *X. vasicola* pv. *vasculorum* tratadas com compostos de cobre. Os autores Bomfeti et al. (2007) também observaram fitotoxidade em plantas de milho tratadas com oxicloreto de cobre e hidróxido de cobre. Diante disto, salienta-se a precaução em utilizar produtos com cobre em sua composição, para pulverização foliar em milho, podendo prejudicar a fotossíntese devido à necrose.

O cobre é um micronutriente que atua nos processos fisiológicos como a fotossíntese e a respiração, tendo um papel importante na defesa das plantas, devido sua participação no metabolismo de compostos fenólicos e biossíntese de lignina. O excesso deste metal pode causar toxidez e prejudicar o desenvolvimento das plantas, sendo que o nível de estresse varia de acordo com a espécie das plantas e intensidade de exposição (BURKHEAD et al., 2009).

A ausência de fitotoxidade na quarta folha da planta tratada com Stop® e Status® pode ser explicada pela característica do cobre quanto a sua mobilidade. Classificado como pouco móvel na planta, este micronutriente apresenta baixa redistribuição no floema (TAIZ et al., 2017).

Vale ressaltar ainda que, em uma solução composta por mais de um elemento químico, estes podem interagir de forma antagônica, sinérgica ou inibitória, afetando assim a maneira de sua absorção (MALAVOLTA, 2006). Desta forma, a ausência de toxidez nas folhas de milho tratadas com All Crim®, produto que contém cobre, pode ser explicada por atividade antagônica do nitrogênio e cálcio sobre o cobre.

Na terceira folha, os produtos All Crim®, Curative® e Bion® se destacaram estatisticamente da testemunha, com redução da AACPD equivalente a 85,2%, 82,7% e 66,5%, respectivamente, na primeira época de condução (Figura 5A - maio de 2021). Esses resultados foram semelhantes na segunda avaliação, em junho de 2021 (Figura 5B), onde o All Crim® apresentou uma inibição correspondente a 77,8%, Curative® com 75,1% e Bion® com 60,3% de redução da AACPD em relação à testemunha, diferindo-se estatisticamente. Os tratamentos com óleo essencial de melaleuca e

Serenade® não apresentaram diferenças significativas em relação à testemunha na terceira folha, em ambas as épocas de condução.

Em relação à quarta folha avaliada, o produto Status® sobressaiu-se estatisticamente dos demais tratamentos com 95,2% (Figura 5A - maio de 2021) e 82% (Figura 5B - junho de 2021) de redução da AACPD em relação à testemunha. Os demais tratamentos, apresentaram diminuição de 81,3% da AACPD com o produto Bion®, 77,5% utilizando o produto Stop®, 70,2% com Curative®, 63,4% com óleo essencial de melaleuca, 61,3% com Serenade® e 53,2% com All Crim® na primeira avaliação realizada em maio de 2021. Já em junho de 2021, os resultados foram semelhantes, com os seguintes resultados de redução da AACPD em relação à testemunha: Bion® (61,2%), Stop® (58,7%), Curative® (49,1%), óleo essencial de melaleuca (49,4%), Serenade® (51,4%) e All Crim® (41,5%).

Alguns dos tratamentos utilizados no presente estudo possuem nutrientes em sua composição: All Crim® (nitrogênio, cálcio e cobre), Curative® (fósforo, potássio, magnésio, enxofre, cobre e níquel) e Stop® (potássio e cobre). Esses componentes podem ter contribuído para a redução da AACPD da estria bacteriana no milho, tendo em vista que além da nutrição das plantas e influência no crescimento, esses nutrientes podem atuar nos mecanismos de defesa das plantas, afetando seu metabolismo (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O produto a base de cobre, nome comercial Fitoforce® Cobre, foi avaliado por Costa et al. (2017b) em plantas de maracujá inoculadas com *X. axonopodis* pv. *passiflorae*. Os autores obtiveram resultados satisfatórios, pois o produto reduziu em 54,41% a severidade da mancha bacteriana, indicando a possibilidade de um componente ativador das reações de defesa vegetal.

O nitrogênio por sua vez, pode ter auxiliado na redução da AACPD do produto All Crim®, tendo em vista que este elemento pode contribuir para a síntese de lignina e fitoalexinas. Pérez et al. (2017) observaram um efeito quadrático para a área abaixo da curva de progresso da mancha aureolada em mudas de cafeeiro, onde o ponto de mínima foi observado com a dose de nitrogênio correspondente a 13,34 mmol L<sup>-1</sup>. Os autores afirmam que o aumento da severidade da doença pode ter ocorrido devido a demanda de carbono na fotossíntese via ciclo de Krebs, e conseqüentemente, maior predisposição do hospedeiro ao patógeno.

Marcuzzo et al. (2016) observaram o efeito do fosfito de potássio no controle de cercosporiose em beterraba. Os autores constataram que o uso isolado do fosfito

de potássio pode reduzir até 71,9% a área abaixo da curva de progresso da doença. Os autores Wordell Filho e Stadnik (2010) observaram redução de 40,4% da AACPD de *Peronospora destructor* em cebola ao utilizarem fosfito de potássio.

Costa et al. (2017a) verificaram a ação do fosfito de potássio no controle de antracnose em feijão. Os autores constataram incremento na atividade de enzimas envolvidas nas respostas de defesa vegetal no feijoeiro e, conseqüentemente, redução da severidade da doença em até 68,7%.

Esses estudos corroboram com os resultados do presente estudo, onde o Curative® (composto por fosfito potássio) também reduziu a severidade da estria bacteriana, comprovando o potencial do produto na indução de resistência das plantas contra doenças nestes patossistemas. Zambolim e Ventura (1993) salientam a importância da não generalização da efetividade de um nutriente em todos os patossistemas.

Os dados obtidos com o produto All Crim® corroboram com estudo desenvolvido por Assi et al. (2018), onde os autores observaram a eficiência de extratos aquoso de alecrim, formulado em pó solúvel, em concentrações de 0,05 a 0,2 g L<sup>-1</sup>, contra mancha bacteriana (*X. vesicatoria*) e pinta preta (*Alternaria solani*) no tomateiro, com controle de até 75% dessas doenças.

A utilização de extratos ou óleo essencial de alecrim vêm crescendo na literatura após autores comprovarem seu benefício na atividade antimicrobiana *in vitro* e controle *in vivo* em vários patossistemas, como mancha da folha e míldio em videira (MAIA et al., 2014). *Phytophthora* sp. e *Fusarium solani* na mandioca (LORENZETTI et al., 2017) e *X. campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae* em couve folha (MATA et al., 2021).

Bion®, composto por acibenzolar-S-metil, atua como indutor de resistência e vêm sendo estudado por diversos autores, que constataram sua efetividade na redução da severidade de doenças causadas por uma ampla gama de patógenos, inclusive no presente estudo com *X. vasicola* pv. *vasculorum* no milho. Uchôa et al. (2014) também verificaram a eficiência do acibenzolar-S-metil na redução da AACPD de Sigatoka-negra em bananeira, obtendo uma redução equivalente a 44,5% utilizando a dose de 0,2 g L<sup>-1</sup>. Siqueira et al. (2019) observaram redução da severidade de antracnose em plantas de feijão caupi tratadas com as doses 0,15; 0,30; 0,45 e 0,60 g L<sup>-1</sup> de ASM aos 4, 8 e 12 dias após a inoculação.

Vishakha et al. (2022) analisaram a atividade antibacteriana de óleo essencial de melaleuca no patógeno *X. oryzae* pv. *oryzae* com uma concentração de 18 mg mL<sup>-1</sup>, sendo que esta dose reduziu significativamente o comprimento da lesão nas folhas de arroz. Além disso, os autores detectaram que não houve toxicidade nas folhas quando somente expostas ao óleo, comprovando que óleo essencial de melaleuca não é tóxico para a planta estudada, sendo uma alternativa no controle da doença. O óleo afetou a membrana celular do patógeno, promovendo a sua desestruturação, além de reduzir a atividade de celulase das bactérias.

Esses dados comprovam que mais estudos podem ser desenvolvidos com óleo essencial de melaleuca para amenizar as lesões nas folhas de milho causadas por *X. vasicola* pv. *vasculorum*, tendo em vista a eficiência em outros patossistemas. A concentração do óleo utilizada é de fundamental importância, sugerindo-se futuros estudos com intervalos e doses superiores ao abordado no presente trabalho.

Os isolados de *Bacillus subtilis* (componente do Serenade®) produzem metabólitos, dentre eles lipopeptídeos das famílias da surfactina, iturina e fengicina, que possuem propriedades antimicrobianas. Em relação às fitobactérias, as surfactinas apresentam baixa propriedade antibacteriana, já as iturinas possuem papel inibitório sobre as bactérias (LANNA FILHO; FERRO; PINHO, 2010).

A redução na severidade de doenças associadas a lipopeptídeos de iturinas também foi comprovado por Zeriuoh et al. (2011) ao avaliarem o controle biológico de *Bacillus subtilis* sobre doenças bacterianas em melão, sendo comprovado através de mutantes deficientes na biossíntese de iturina.

Os autores Massomo et al. (2004) avaliaram a atividade de 80 cepas de *Bacillus*, onde aproximadamente 35% delas apresentaram atividade contra *X. campestris* pv. *campestris* em ágar e reduziram a incidência e severidade desta doença em plântulas de repolho. Ainda no estudo, foi observado que a aplicação de *Bacillus subtilis* nas raízes apresentou um efeito duradouro na proteção das plantas contra a bactéria causadora de podridão negra.

De acordo com as informações mencionadas, o isolado de *Bacillus subtilis* pode apresentar atividade de indução de resistência no hospedeiro reduzindo a severidade das doenças, sendo dependente de alguns fatores, como dose aplicada, cultura e patógeno.

#### 4.5 ANÁLISE BIOQUÍMICA

A atividade enzimática de peroxidase apresentou diferença significativa para a terceira folha (tratada e inoculada) e quarta folha de milho (apenas inoculada) (Figura 6).

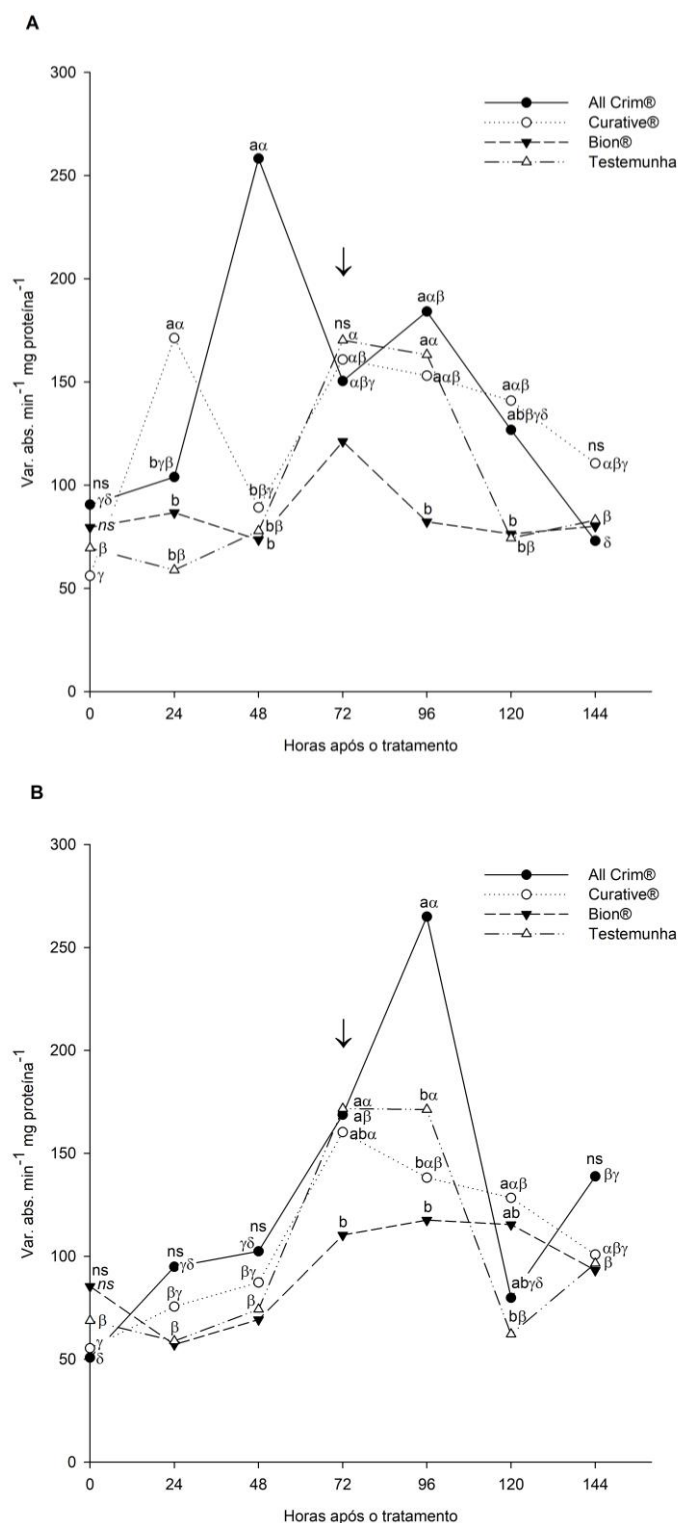


Figura 6 - Atividade de peroxidase em milho tratado com All Crim®, Curative® e Bion®. Os tratamentos foram realizados na terceira folha expandida 72 horas antes da inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que ocorreu na terceira (A) e quarta folhas expandidas (B). A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação do patógeno, 72 horas após o tratamento. Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras latinas para comparação dos tratamentos dentro de cada tempo; letras gregas para comparação entre os tempos dentro de um tratamento); ns: não significativo.



Na terceira folha de milho (Figura 6A) o pico na atividade de peroxidase ocorreu em 48 horas após a aplicação do tratamento com All Crim®, indicando a ativação de mecanismos de defesa da planta de milho com a proteção local.

O Curative® apresentou dois picos de indução na folha de milho tratada e inoculada. O primeiro pico ocorreu no tempo 24 horas após o tratamento e o segundo pico se manteve entre 72 e 120 horas, manifestando-se logo após o início do processo infeccioso. A manutenção elevada da atividade enzimática após a inoculação dificulta o estabelecimento do patógeno no tecido vegetal, demonstrando um potencial do tratamento na indução de resistência do milho.

A testemunha apresentou um comportamento estável para a peroxidase até o momento da inoculação do patógeno, após isso, no tempo 72 horas houve incremento da atividade que se manteve até as 96 horas. Esse acréscimo confirma que as plantas podem ativar mecanismos de defesa após o início do processo infeccioso, independente dos tratamentos, porém não perdura por muito mais tempo, tornando a planta exposta novamente ao ataque de patógenos.

Na quarta folha de milho (Figura 6B) não houve diferença significativa até as 48 horas após a aplicação dos tratamentos, sendo que após a inoculação da bactéria, no tempo de 72 horas, a atividade da peroxidase apresentou incremento para os tratamentos All Crim®, Curative® e testemunha.

Destaca-se ainda o pico da atividade enzimática para o tratamento All Crim® em 96 horas, demonstrando que o produto ativou a enzima de defesa após a inoculação do patógeno, podendo ter evitado a entrada ou a atividade das bactérias no tecido vegetal. Esse incremento demonstra um processo de indução de resistência, pois apresentou alteração no mecanismo de defesa do milho. Esse comportamento também comprova o efeito sistêmico do produto.

Ao analisar os tratamentos isoladamente, o Curative® proporcionou um aumento gradativo da peroxidase até o momento de inoculação do patógeno, onde houve o pico da atividade, seguido de um decréscimo até as 144 horas após o tratamento. O All Crim®, por sua vez, apresentou um elevado acréscimo em 72 e 96 horas, decrescendo drasticamente a atividade enzimática após esses tempos de avaliação. A testemunha apresentou incremento da atividade de peroxidase nos tempos de 72 e 96 horas, demonstrando que a planta possui alteração independente na atividade bioquímica após a presença do patógeno no tecido vegetal.

Tanto na terceira folha quanto na quarta folha de milho, o tratamento com Bion® não apresentou acréscimo da atividade da enzima peroxidase, porém, não se descarta o tratamento como um possível indutor de resistência, tendo em vista que outras enzimas também são responsáveis pelos mecanismos de defesa das plantas.

Conforme Stangarlin et al. (2011), a atividade da enzima peroxidase atua em reposta de resistência de diversos patossistemas, pois participa da oxidação de compostos fenólicos da parede celular, que se acumulam em resposta à infecção. Além disso, a peroxidase também está associada a biossíntese de lignina das células vizinhas àquelas infectadas, dificultando a penetração do patógeno e a difusão de suas toxinas.

A peroxidase pode desencadear uma série de processos fisiológicos que são dependentes de elementos minerais como cálcio, cobre, potássio e nitrogênio, presentes nas composições dos tratamentos utilizados, afetando a senescência, fotossíntese, crescimento e desenvolvimento celular (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O tratamento com All Crim® possui em sua composição extrato de alecrim e os nutrientes cálcio, nitrogênio e cobre, que garantem a nutrição da planta e estão envolvidos nos mecanismos de defesa das mesmas (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

O cálcio possui papel fundamental na estabilidade dos tecidos vegetais, pois atua diretamente na estrutura e funcionalidade da parede celular (MELLO et al., 2017). Além disso, é fundamental no reconhecimento de patógenos ao infectarem as plantas, atuando como mensageiro secundário, ativando enzimas de defesa (BEDENDO; AMORIM; MATTOS-JÚNIOR, 2018). Dessa forma, o cálcio presente no All Crim® pode ter atuado no reconhecimento do patógeno e ativado os mecanismos de defesa latentes na planta de milho.

Em estudos conduzidos por Costa et al. (2017a), os autores constataram que o fosfito de potássio controlou a antracnose no feijoeiro, além de observarem incremento da atividade de peroxidase nos tecidos. Assim como para Li, He e Jin (2009) que constataram a ativação de peroxidase em plantas de milho inoculadas com *Fusarium graminearum* e tratadas com potássio, conseqüentemente, reduzindo a severidade da doença. Isto corrobora com o presente estudo, onde o Curative® apresentou incremento da atividade enzimática.

Estevez (2018) observou aumento significativo da atividade de peroxidase em eucalipto tratado com sulfato de cálcio, apresentando um resultado dose-dependente. Esses dados, juntamente com o presente estudo, onde o All Crim® possui cálcio em

sua composição, comprova a teoria já proposta por Haissig (1986), que o cálcio favorece a ativação da enzima peroxidase.

A atividade de polifenoloxidase na terceira e quarta folha de milho apresentaram diferença significativa (Figura 7).

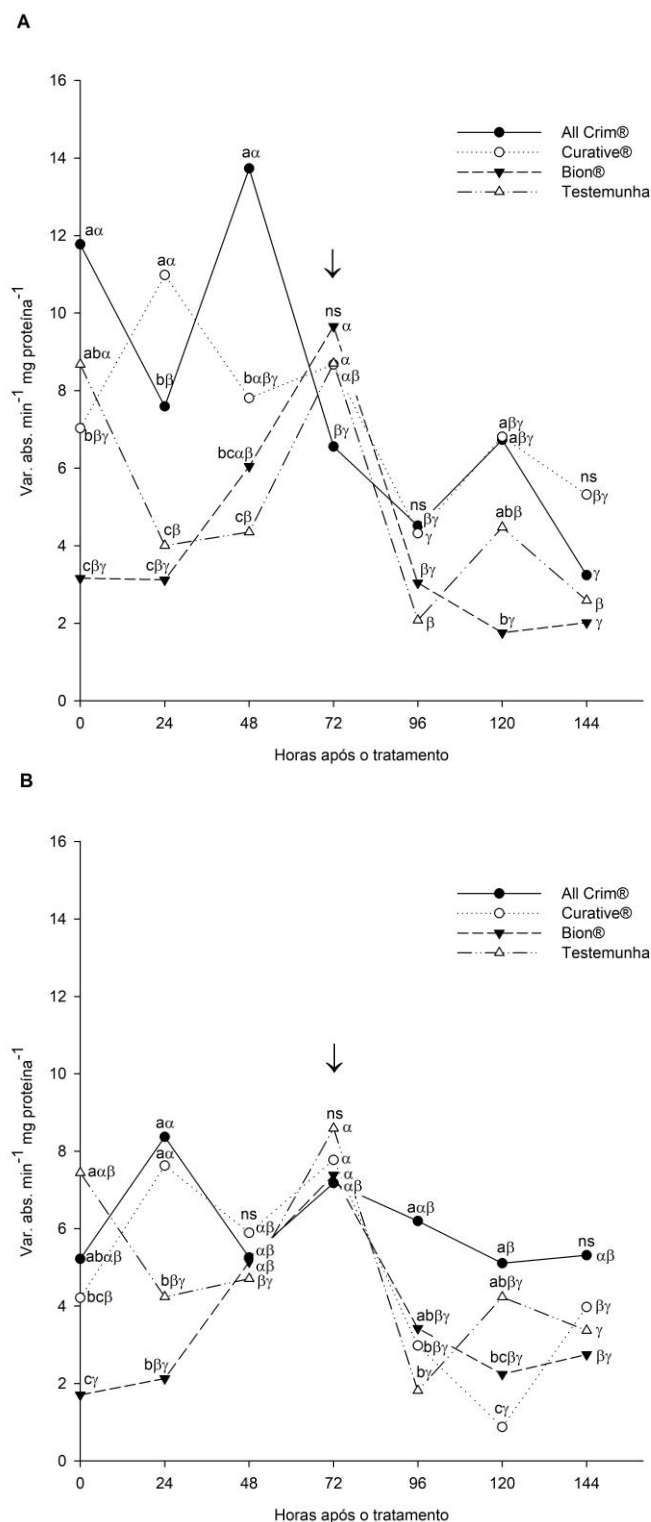


Figura 7 - Atividade de polifenoloxidade em milho tratado com All Crim®, Curative® e Bion®. Os tratamentos foram realizados na terceira folha expandida 72 horas antes da inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que ocorreu na terceira (A) e quarta folhas expandidas (B). A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação do patógeno, 72 horas após o tratamento. Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras latinas para comparação dos tratamentos dentro de cada tempo; letras gregas para comparação entre os tempos dentro de um tratamento); ns: não significativo.

Na terceira folha de milho (Figura 7A), que recebeu o tratamento e inoculação, pode-se observar o maior pico na atividade de polifenoloxidase ocorrendo no tempo 48 horas com o tratamento All Crim®, correspondente a 215,59% em relação à testemunha. O pico para o tratamento Curative® ocorreu em 24 horas, com incremento de 174,41% comparado à testemunha.

O tratamento com Bion® por sua vez, apresentou pico apenas no momento da inoculação do patógeno, no tempo 72 horas, decaindo a atividade enzimática nos tempos seguintes. Esse comportamento pode ser observado em ambas as folhas.

Na quarta folha de milho, somente inoculada (Figura 7B), é possível constatar um pico no tempo 24 horas, seguido de uma redução da atividade enzimática no tempo 48 horas, e em 72 horas um segundo pico da atividade para os tratamentos All Crim® e Curative®.

Após a inoculação do patógeno, a atividade desta enzima decaiu em todos os tratamentos, afirmando-se desta maneira, que os tratamentos avaliados não foram eficientes como eliciadores para ativar a enzima de defesa polifenoloxidase na presença do patógeno.

Martins et al. (2021) não observaram incremento da atividade enzimática de polifenoloxidase em plantas de milho tratadas com Bion®. Em contrapartida, o estudo desenvolvido por Kumar et al. (2017) contra a podridão do colmo (*Dickeya zae*) em 80 linhagens de milho, demonstrou que as linhagens de milho consideradas moderadamente resistentes à doença apresentaram maior atividade de polifenoloxidase em relação às linhagens moderadamente suscetíveis e altamente suscetíveis.

O extrato de alecrim com concentração de 5% apresentou incremento na atividade de polifenoloxidase na soja inoculada com *Macrophomina phaseolina*, com constante aumento desde o tempo 36 horas após o tratamento, até 120 horas (LORENZETTI et al., 2018).

Em estudo com fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides* em cafeeiro, Ogoshi (2011) observou um pico da atividade de polifenoloxidase que decaiu após a inoculação do patógeno, corroborando com o presente estudo, onde o pico da atividade enzimática foi observado após o tratamento, antecedendo a inoculação da bactéria.

A atividade da polifenoloxidase é um fator importante na resistência de doenças, devido a sua capacidade de oxidar compostos fenológicos em quinonas, que

são tóxicas aos microrganismos, e também por participarem no processo de lignificação da parede celular vegetal (ZAMBOLIM; VENTURA, 1993).

A atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em folhas de milho tratadas com All Crim®, Bion® e Curative®, inoculada com *X. vasicola* pv. *vasculorum* (A) e também na folha acima apenas inoculada com o patógeno (B), pode ser observada na Figura 8.

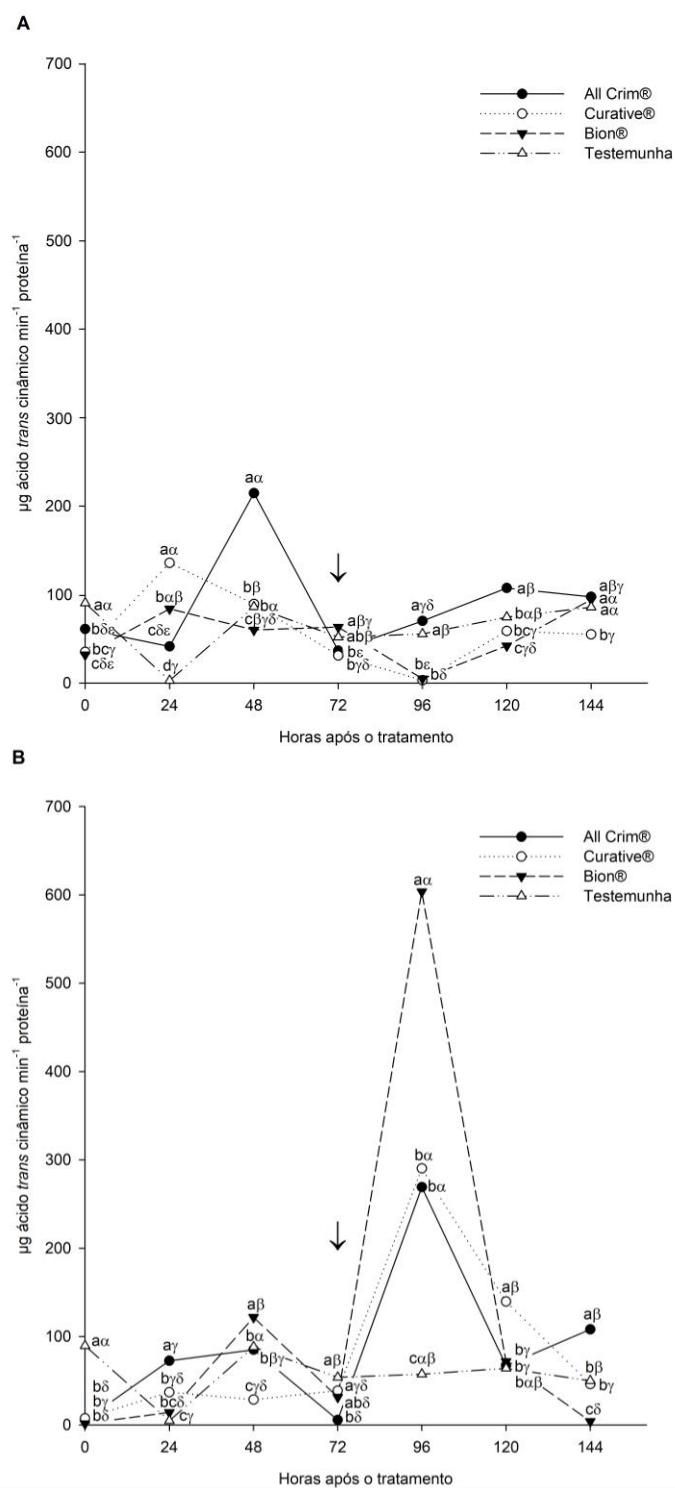


Figura 8 - Atividade de fenilalanina amônia-liase (FAL) em milho tratado com All Crim®, Curative® e Bion®. Os tratamentos foram realizados na terceira folha expandida 72 horas antes da inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, que ocorreu na terceira (A) e quarta folha expandida (B). A testemunha corresponde a plantas não tratadas e inoculadas com o patógeno. A seta indica a inoculação do patógeno, 72 horas após o tratamento. Nota: as médias seguidas da mesma letra não diferem pelo teste de Tukey a 5% de significância (letras latinas para comparação dos tratamentos dentro de cada tempo; letras gregas para comparação entre os tempos dentro de um tratamento).

A terceira folha de milho (Figura 8A), tratada e inoculada, apresentou o primeiro pico para o tratamento Curative® no tempo 24 horas, seguindo de um segundo pico com o All Crim® no tempo 48 horas. Após a inoculação do patógeno, em 72 horas, a atividade enzimática de FAL não apresentou grandes picos, sendo que, apenas em 120 horas, o All Crim® foi superior estatisticamente em relação à testemunha.

Na quarta folha de milho, a qual não recebeu tratamento, sendo apenas inoculada com o patógeno, o destaque ocorreu no tempo 96 horas para o tratamento Bion®, seguido dos tratamentos com Curative® e All Crim® que se assemelharam estatisticamente (Figura 8B), demonstrando a ativação de mecanismos de defesa bioquímicos após a planta ser submetida ao ataque da bactéria. Esses picos da atividade em relação à testemunha demonstram o comportamento sistêmico dos tratamentos.

O All Crim® apresentou dois picos de ativação da FAL, o primeiro pico ocorrendo em 24 horas e permanecendo até 48 horas, onde a planta pode ter entrado em estado de alerta (*priming*) e após o reconhecimento do patógeno, a planta ativou os mecanismos de defesa por meio da FAL, ocorrendo então o segundo pico em 96 horas. Esse mesmo comportamento pode ser observado para o tratamento com Bion®, onde o primeiro pico ocorreu em 48 horas após o tratamento, e o segundo pico em 96 horas, posterior à inoculação do patógeno.

O Curative®, por sua vez, apresentou o pico da atividade de FAL em 96 horas e permaneceu estatisticamente superior no tempo 120 horas. Essa permanência de alta atividade enzimática é positiva, pois retarda ou evita o estabelecimento do patógeno por um período maior no tecido vegetal.

A FAL é uma enzima chave da rota dos fenilpropanoides, essencial para biossíntese pois transforma L-fenilalanina em ácido *trans*-cinâmico e amônia, que por sua vez, podem ser incorporados em diferentes compostos fenológicos, presentes na formação de flavonoides e ligninas (STANGARLIN et al., 2011).

Estudos conduzidos por Bruzamarello et al. (2018) demonstraram que o fosfito de potássio e o ASM na soja possuem capacidade de ativar mecanismos de defesa vegetal, através da ativação da enzima FAL, ao inocular as plantas com *Phakopsora pachyrhizi*.

A atividade de FAL em milho também foi estudada por Li, He e Jin (2009), onde foi possível constatar que o tratamento com potássio alcançou maior atividade



da enzima em relação ao tratamento sem adição de potássio. Após a inoculação de *Fusarium graminearum*, houve decréscimo e posterior aumento da atividade de FAL.

Os autores González-Mendoza et al. (2018) observaram alterações na atividade de FAL em folhas de *Prosopis glandulosa*, um arbusto espinhoso de porte médio, tratado com cobre. Neste sentido, os autores indicam a alta produção de compostos fenólicos e flavonoides sobre a influência do cobre, consistindo em aumento significativo na atividade de FAL.

## 5 CONCLUSÕES

A inoculação de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* em milho por aspersão ou no cartucho, com concentração de  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> é a combinação que proporciona a maior severidade da doença estria bacteriana.

Os produtos All Crim®, Curative® e Bion® causaram redução entre 60 e 85% na folha de milho tratada em relação à testemunha. Já nas folhas não tratadas, essa redução foi entre 41 e 81%, indicando controles local e sistêmico.

As enzimas peroxidase, polifenoloxidase e fenilalanina amônia-liase apresentaram ação controle nas folhas de milho inoculadas com *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, tratadas com All Crim®, Curative® e Bion®.

Desta maneira, sugere-se um aprofundamento nos estudos para cada produto, tendo em vista que os mesmos apresentaram potencial para complementar o controle da estria bacteriana na cultura do milho, por meio da indução de resistência.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D. G.; MARTINS, W. S.; MIRANDA, F. F. R. Indução de resistência ao crestamento gomoso do caule em melanciaira com uso de fosfito. **Revista Sítio Novo**, v. 5, n. 1, p. 118-127, 2021.
- AGRIOS, G. N. **Plant Pathology**. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2005. 922 p.
- ALMEIDA, H. O.; BARBOSA, M. O.; MARQUES, A. E.; PEREIRA, T. H. A.; MAGALHÃES JÚNIOR, M. J.; TESSAROLLO, N. G.; GAMES, P. D.; BARROS, E. G.; STOLF-MOREIRA, R.; MARCELINO-GUIMARÃES, F. C.; ABDELNOOR, R. V.; PEREIRA, P. R. G.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Enzimas marcadoras de indução de resistência diferencialmente reguladas em soja resistente e suscetível à ferrugem-asiática-da-soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 2, p. 163-172, 2012.
- ALVES, J. V. S.; COELHO, M. P.; BERTAN, F. L.; SILVA, D. C.; SILVA, V. C.; CHIAMULERA, M. T.; CARVALHO, I. F.; SILVA, C. A.; ARAÚJO, D. V. Indução de resistência a *Colletotrichum* sp. em *Heliconia psittacorum* x *sparthocircinata* cv. Golden Torch cultivada em ambiente sombreado e pleno sol. **Summa Phytopathologica**, v. 46, n. 4, p. 320-326, 2020.
- AMARAL, T. A.; ANDRADE, C. D.; LIMA, A. C. R.; DE SOUZA, I. R. P.; SOUZA, A. D. C.; TEIXEIRA, T. C.; PAIXÃO, J. S. Análise da sensibilidade da cultura do milho às mudanças climáticas empregando modelos de simulação: 3-resposta às alterações na taxa de radiação solar. In: XXX CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2014, Salvador. **Anais...** Sete Lagoas: Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2014.
- AMBROSINI, V. G.; SORIANI, H. H.; ROSA, D. J.; TIECHER, T. L.; GIROTTO, E.; SIMÃO, D. G.; MELO, G. W. B.; ZALAMENA, J.; BRUNETTO, G. Impacto do excesso de cobre e zinco no solo sobre videiras e plantas de cobertura. In: MELO, G. W. B.; ZALAMENA, J.; BRUNETTO, G.; CERETTA, C. A. **Calagem, adubação e contaminação em solos cultivados com videiras**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2016, p. 91-110.
- AMORIM, L.; PASCHOLATI, S. F. Ciclo de relações patógeno-hospedeiro. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 45-70.
- ANDRADE, C. L.; PEREIRA, P. E.; BRITO, R. A. L.; RESENDE, M. **Viabilidade e manejo da irrigação da cultura do milho**. Sete Lagoas (MG): Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 12 p. (Circular Técnica 85).
- ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Tropical plant pathology**, v. 35, n. 1, p. 54-59, 2010.

ARIAS, S. L.; BLOCK, C. C.; MAYFIELD, D. A.; SANTILLANA, G.; STULBERG, M. J.; BRODERS, K. D.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; MUNKVOLD, G. P. Occurrence in seeds and potential seed transmission of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in maize in the United States. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1139-1146, 2020.

ASSI, L.; VIECELLI, C. A.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; MEINERZ, C. C.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. Controle de pinta preta e de mancha bacteriana em tomateiro por extrato formulado de *Rosmarinus officinalis*. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 4, p. 355-360, 2018.

BARROS, J. F. C.; CALADO, J. G. **A cultura do milho**. Portugal: Universidade de Évora, 2014. 52 p.

BEDENDO, I. P. Classificação de doenças. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 313-316.

BEDENDO, I. P.; AMORIM, L.; MATTOS-JÚNIOR, D. Ambiente e doença. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 93-103.

BELASQUE JÚNIOR, J.; JESUS JÚNIOR, W. C. Concentração de inóculo e método de inoculação de *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. **Laranja**, v. 27, n. 2, p. 263-272, 2006.

BERGAMIN FILHO, A.; AMORIM, L. Princípios gerais de controle. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 215-228.

BOMFETI, C. A.; MEIRELLES, W. F.; SOUZA-PACCOLA, E. A.; CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; MARRIEL, I. E.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Avaliação de produtos químicos comerciais, *in vitro* e *in vivo* no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoea ananatis*. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n. 1, p. 63-67, 2007.

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

BRAGA, K.; FANTIN, L. H.; ROY, J. M. T.; CANTERI, M. G.; CUSTÓDIO, A. A. P. Development and validation of a diagrammatic scale for the assessment of the severity of bacterial leaf streak of corn. **European Journal of Plant Pathology**, v. 157, n. 2, p. 367-375, 2020.

BRODERS, K. Status of bacterial leaf streak of corn in the United States. In: INTEGRATED CROP MANAGEMENT CONFERENCE, 2017, Iowa. **Proceedings...** Iowa: ICM, 2017. p. 111-115.

BRUZAMARELLO, J.; FRANCESCHI, V. T.; DALACOSTA, N. L.; GONÇALVES, I.; MAZARO, S. M.; REIS, E. Potencial de fosfitos na indução da resistência em plantas de soja. **Cultura Agrônômica**, v. 27, n. 3, p. 263-273, 2018.

BURKHEAD, J. L.; REYNOLDS, K. A. G.; ABDEL-GHANY, S. E.; COHU, C. M.; PILON, M. Copper homeostasis. **New Phytologist**, v. 182, n. 4, p. 799-816, 2009.

CARVALHO, R. V.; PEREIRA, O. A. P.; CAMARGO, L. E. A. Doenças do milho. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Eds). **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2016, p. 549-560.

CHAGAS, J. F. R.; SANTOS, G. R.; COSTA, R. V.; COTA, L. V.; SILVA, D. D.; SIMON, J.; MOURÃO, D. S. C. **Principais doenças foliares da cultura do milho no estado do Tocantins**. Sete Lagoas (MG): Embrapa Milho e Sorgo, 2015. 13 p. (Circular Técnica (213)).

CHOWDAPPA, P.; KUMAR, S. P. M.; LAKSHMI, M. J.; UPRETI, K. K. Growth stimulation and induction of systemic resistance in tomato against early and late blight by *Bacillus subtilis* OTPB1 or *Trichoderma harzianum* OTPB3. **Biological control**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 2013.

COMPANT, S.; DUFFY, B.; NOWAK, J.; CLÉMENT, C.; BARKA, E. A. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 9, p. 4951-4959, 2005.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**. v. 9, Safra 2020/21, n. 9. Nono levantamento, 2022.

COSTA, B. H. G.; RESENDE, M. L. V.; MONTEIRO, A. C. A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M. R.; BOTELHO, D. M. S.; SILVA, B. M. Potassium phosphites in the protection of common bean plants against anthracnose and biochemical defence responses. **Journal of Phytopathology**, v. 166, n. 2, p. 95-102, 2017a.

COSTA, R. C.; ISHIDA, A. K. N.; MIRANDA, V. S.; DAMASCENO FILHO, A. S.; SILVA, C. T. B.; RESENDE, M. L. V.; OLIVEIRA, L. C. Extratos vegetais, formulações a base de extrato vegetal e produtos químicos no controle da mancha bacteriana do maracujazeiro. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 7, n. 1, p. 26-33, 2017b.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A. P.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; VIANA, J. H. M.; OLIVEIRA, M. F.; MATRANGOLO, W. J. R., ALBUQUERQUE FILHO, M. R. **Cultivo do milho**. Sete Lagoas (MG): Embrapa milho e sorgo, 2010. 10 p. (Sistema de produção 2).

DUANGMAL, K.; APENTEN, R. K. O. A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 351-359, 1999.

DUARTE, R. P.; JULIATTI, F. C.; FREITAS, P. T. Eficácia de diferentes fungicidas na cultura do milho. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 4, p. 101-111, 2009.

DUIN, I. M.; FORASTEIRO, T. A.; RODRIGUES, V. H. S.; BALBI-PEÑA, M. I.; LEITE JÚNIOR, R. P. *In vitro* sensitivity of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* and the control of bacterial leaf streak of corn with copper oxychloride alone and in mixtures with mancozeb and fluxapyroxad. **European Journal of Plant Pathology**, v. 164, n. 2, p. 263-258, 2022.

DYER, R. A. Botanical surveys and control of plant diseases. **Farming in South Africa**, v. 24, n. 275, p. 119-121, 1949.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivo do Milho**. Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas (MG), 2015. Disponível em: <[https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemaasdeproducaolf6](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemaasdeproducaolf6)>. Acesso em: 29 nov. 2021.

ESTEVEZ, R. L. **Efeito protetivo de um produto comercial a base de sulfato de cálcio (Fert Protetor®) em cafeeiro, eucalipto e feijoeiro**. 2018. 57 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Marechal Cândido Rondon, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, P. S. F.; TEBALDI, N. D. Métodos de inoculação de *Xanthomonas campestris* pv. *passiflorae* em maracujazeiro e biofertilizantes na inibição do crescimento bacteriano *in vitro*. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 2, p. 207-209, 2019.

FONTOURA, D.; COSTA, A. C. T.; STANGARLIN, J. R.; TSUTSUMI, C. Y. Disease resistance induction in second-season corn using acibenzolar-S-methyl and phosphorylated mannanoligosaccharide. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6, p. 3657-3663, 2015.

FU, Z. Q.; DONG, X. Systemic acquired resistance: Turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, v. 64, p. 839-863, 2013.

GONÇALVES, R.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. Armazenamento de microrganismos em cultura com ênfase em fungos fitopatogênicos. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016, p. 93-105.

GONZÁLEZ-MENDOZA, D.; TRONCOSO-ROJAS, R.; GONZALEZ-SOTO, T.; GRIMALDO-JUAREZ, O.; CECEÑA-DURAN, C.; DURAN-HERNANDEZ, D.; GUTIERREZ-MICELI, F. Changes in the phenylalanine ammonia lyase activity, total phenolic compounds, and flavonoids in *Prosopis glandulosa* treated with cadmium and Copper. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 2, p. 1465-1472, 2018.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. **Micronutrients in Agriculture**, v. 4, p. 329-370, 1991.

HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 40, n. 1, p. 347-369, 1989.

HAISSIG, B. E. Metabolic processes in adventitious rooting of cuttings. In: JACHSON, M. B. (Ed). **New root formation in plants and cuttings**. Dordrecht: The Netherlands, 1986, p. 141-189.

HAMMERSCHMIDT, T. R.; NUCLES, E. M.; KUĆ, J. Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological Plant Pathology**, v. 20, n. 1, p. 73-82, 1982.

HARTMAN, T.; HARBOUR, J.; THARNISH, B.; METER, J. V.; JACKSON-ZIEMS, T. A. Agronomic factors associated with bacterial leaf streak development caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in corn. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1132-1138, 2020a.

HARTMAN, T.; THARNISH, B.; HARBOUR, J.; YUEN, G. Y.; JACKSON-ZIEMS, T. A. Alternative hosts in the families Poaceae and Cyperaceae for *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, causal agent of bacterial leaf streak of corn. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1147-1152, 2020b.

HENDGES, C.; STANGARLIN, J. R.; ZAMBAN, V. C.; MASCARO, M. H. N.; CARMELO, D. B. Antifungal activity and control of the early blight in tomato through tea tree essential oil. **Crop Protection**, v. 148, p. 105728, 2021.

ITAKO, A. T.; TOLENTINO JÚNIOR, J. B.; SILVA JÚNIOR, T. A. F.; SOMAN, J. M.; MARINGONI, A. C. Efeito de produtos químicos sobre a mancha bacteriana (*Xanthomonas perforans*) e na ativação de proteínas relacionadas à patogênese em tomateiro. **Idesia**, v. 30, n. 2, p. 85-92, 2012.

JONES, D. H. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. **Phytochemistry**, v. 23, n. 7, p. 1349-1359, 1984.

KAR, M.; MISHRA, D. Catalase, peroxidase, and polyphenoloxidase activities during rice leaf senescence. **Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 315-319, 1976.

KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, v. 32, n. 1, p. 439-459, 1994.

KORUS, K. A.; LANG, J. M.; ADESEMOYE, A. O.; BLOCK, C. C.; PAL, N.; LEACH, J. E.; JACKSON-ZIEMS, T. A. First report of *Xanthomonas vasicola* causing bacterial leaf streak on corn in the United States. **Plant Disease**, v. 101, n. 6, p. 1030, 2017.

KUHN, O. J.; PORTZ, R. L.; STANGARLIN, J. R.; ÁGUILA, R. M. D.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FRANZENER, G. Efeito do extrato aquoso de cúrcuma (*Curcuma longa*) em *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, n. 1, p. 13-20, 2006.

KUMAR, A.; HUNJAN, M. S.; KAUR, H.; DHILLON, H. K.; SINGH, P. P. Biochemical responses associated with resistance to bacterial stalk rot caused by *Dickeya zeae* in maize. **Journal of Phytopathology**, v. 165, n. 11-12, p. 822-832, 2017.

LANG, J. M.; DUCHARME, E.; IBARRA CABALLERO, J.; LUNA, E.; HARTMAN, T.; ORTIZ-CASTRO, M.; KORUS, K.; RASCOE, J.; JACKSON-ZIEMS, T. A.; BRODERS, K.; LEACH, J. E. Detection and characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb 1894) comb. nov. causing bacterial leaf streak of corn in the United States. **Phytopathology**, v. 107, n. 11, p. 1312-1321, 2017.

LANNA FILHO, R.; FERRO, H. M.; PINHO, R. S. C. Controle biológico mediado por *Bacillus subtilis*. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, v. 4, n. 2, p. 12-20, 2010.

LEITE JÚNIOR, R. P.; CUSTÓDIO, A. A. P.; MADALOSSO, T.; ROBAINA, R. R.; DUIN, I. M.; SUGAHARA V. H. **Estria Bacteriana do Milho no Paraná**. Londrina (PR): IAPAR, 2018a. 24 p. (Informe da pesquisa nº 160).

\_\_\_\_\_. First report of the occurrence of bacterial leaf streak of corn caused by *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 1, p. 145, 2018b.

LI, W.; HE, P.; JIN, J. Potassium influenced phenylalanine ammonia-lyase, peroxidases and polyphenol oxidases in *Fusarium graminearum* infected maize (*Zea mays* L.). In: PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL PLANT NUTRITION COLLOQUIUM XVI, 2009, Davis. **Proceedings...** Davis (CA): University of California, 2009.

LIMA, L. D.; BARBOSA, J. M. P.; MEDEIROS, M. B. C. L.; OLIVEIRA, M.; CARVALHO, J. S. B.; MOREIRA, K. A. Avaliação bioquímica e fisiológica em tomateiro (*Solanum lycopersicum* L.) submetida ao indutor de resistência acibenzolar-s-metil. **Diversitas Journal**, v. 5, n. 4, p. 2374-2393, 2020.

LORENZETTI, E.; NETO, A. J. A.; SILVA, I. F.; STANGARLIN, J. R. Ação do extrato de alecrim contra *Phytophthora* sp. e *Fusarium solani*. **Revista Cultivando o Saber**, v. 10, n. 1, p. 49-55, 2017.

LORENZETTI, E.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; PORTZ, R. L. Indução de resistência à *Macrophomina phaseolina* em soja tratada com extrato de alecrim. **Summa Phytopathologica**, v. 44, n. 1, p. 45-50, 2018.

LUCAS, G. C.; ALVES, E.; PEREIRA, R. B.; PERINA, F. J.; SOUZA, R. M. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 3, p. 351-359, 2012.

MAČIONIENĖ, I.; ČEPUKOIT, D.; ŠALOMSKIENĖ, J.; ČERNAUSKAS, D.; BUROKIENĖ, D.; ŠALAŠEVIČIENĖ, A. Effects of natural antimicrobials on *Xanthomonas* strains growth. **Horticulturae**, v. 8, n. 7, p. 1-13, 2022.



MAFIA, R. G.; ALFENAS, A. C.; GONÇALVES, R. C. Detecção, isolamento e inoculação de bactérias fitopatogênicas. In: ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. (Eds). **Métodos em fitopatologia**. Viçosa: UFV, 2016, p. 145-170.

MAGALHÃES, P. C.; DURÃES, F. O. M. **Fisiologia da produção de milho**. Sete Lagoas (MG): Embrapa Milho e Sorgo, 2006. 10 p. (Circular Técnica 76).

MAIA, A. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; FARIA, C. M. D. R.; OLIVEIRA, J. S. B.; JARDINETTI, V. A.; BATISTA, B. N. Óleo essencial de alecrim no controle de doenças e na indução de resistência em videira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 49, n. 5, p. 330-339, 2014.

MALAVOLTA, E. **Manual de nutrição mineral de plantas**. São Paulo: Agronômica Ceres, 2006. 638 p.

MARCUZZO, L. L.; DUARTE, T. S.; ROSA NETO, A. J.; HOFFMANN, F. Efeito de fosfito de potássio e de fungicidas no controle da cercosporiose (*Cercospora beticola*) da beterraba. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 186-187, 2016.

MARIANO, R. L. R.; ASSIS, S. M. P. Quantificação de inóculo de bactérias fitopatogênicas. In: MARIANO, R. L. R. (Ed.) **Manual de Práticas em Fitobacteriologia**. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000, p. 49-52.

MARQUES, E.; UESUGI, C. H.; FERREIRA, M. A. S. V. Sensitivity to cooper in *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*. **Tropical Plant Pathology**, v. 34, n. 6, p. 406-411, 2009.

MARTINS, J. V. S.; SILVA, H. F.; SOUSA, V. F. O.; SILVA, T. I.; DIAS, T. J.; RIBEIRO, W. S.; NASCIMENTO, L. C. Elicitors increase gas exchanges and induce the *Zea mays* antioxidant system. **Emirates Journal of Food and Agriculture**, v. 33, n. 11, p. 958-964, 2021.

MASSOMO, S. M. S.; MORTENSEN, C. N.; MABAGALA, R. B.; NEWMAN, M. A.; HOCKENHULL, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of cabbage in Tanzania with *Bacillus* strains. **Journal of Phytopathology**, v. 152, n. 2, p. 98-105, 2004.

MATA, T. C.; STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; LORENZETTI, E.; CARVALHO, J. C.; DEMARTELAERE, A. C. F.; BRITO, O. D. C.; COSTA, A. P.; ASSI, L. Atividade antimicrobiana de formulados a base de alecrim contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* e *Alternaria brassicae*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 9, p. 94220-94236, 2021.

MEHLHORN, H. Ethylene-promoted ascorbate peroxidase activity protects plants against hydrogen peroxide, ozone and paraquat. **Plant, Cell and Environment**, v. 13, n. 9, p. 971-976, 1990.

MEIER, D. A cytological study of the early infection stages of the black rot of cabbage. **Torrey Botanical Society**, v. 61, n. 4, p. 173-190, 1934.

MELLO, M. R. F.; SOUZA, E. B.; PINTO, K. M. S.; GAMA, M. A. S.; MARIANO, R. L. R. Redução da podridão mole em couve-chinesa mediada por indutores de resistência. **Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE**, v. 9, n. 2, p. 15-24, 2017.

MENEZES, V. O.; PEDROSO, D. C.; DILL, A. M.; SANTOS, R. F.; MULLER, J.; JUNGES, E.; MUNIZ, M.; BLUME, E. Uso de extratos vegetais *in vivo* no controle de *Alternaria solani* e na produtividade do tomateiro. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 1108-1112, 2009.

MERCADO-FLORES, Y.; CÁRDENAS-ÁLVAREZ, I. O.; ROJAS-OLVERA, A. V.; PÉREZ-CAMARILLO, J. P.; LEYVA-MIR, S. G.; ANDUCHO-REYES, M. A. Application of *Bacillus subtilis* in the biological control of the phytopathogenic fungus *Sporisorium reilianum*. **Biological Control**, v. 76, p. 36-40, 2014.

MEW, T. W.; MEW, I. P. C.; HUANG, J. S. Scanning electron microscopy of virulent and avirulent strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* on rice leaves. **Phytopathology**, v. 74, n. 6, p. 635-641, 1984.

MOHAMMADI, M.; KAZEMI, H. Changes in peroxidases and polyphenol oxidases activities in susceptible and resistance wheat heads inoculated with *Fusarium graminearum* and induced resistance. **Plant Science**, v. 162, n. 4, p. 491-498, 2002.

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

MORINIGO, F. T. Á.; OCAMPOS, C. G. Induction of resistance to the bacterial spot (*Xanthomonas campestris* pv. *sesami*) in sesame (*Sesamum indicum* L.) plants. **Investigación Agraria**, v. 15, n. 2, p. 97-105, 2013.

NASCIMENTO, A. R. P.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; VIANA, I. O. Reação de clones de videira a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola*, baseada nos componentes epidemiológicos do cancro bacteriano. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2006.

NEUMANN, M. M.; SPADOTTO, D. V.; CRESTANI, N.; ACUNHA, J. G. Efeito do indutor de resistência acibenzolar-S-methyl (ASM) associado a fungicidas no controle de doenças foliares em milho. In: XXXI CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 2016, Bento Gonçalves. **Anais...** Sete Lagoas (MG): Associação Brasileira de Milho e Sorgo, 2016.

OGOSHI, C. **Fosfito de potássio no controle de *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado de Plantas de cafeeiro com sintomas de mancha manteigosa**. 2011. 90 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

ORTIZ, A. M. M.; ZAPATA, J. C. Evaluación *in vitro* de inductores de resistencia sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín**, v. 65, n. 1, p. 6327-6336, 2012.

ORTIZ-CASTRO, M.; HARTMAN, T.; COUTINHO, T.; LANG, J. M.; KORUS, K.; LEACH, J. E.; JACKSON-ZIEMS, T.; BRODERS, K. Current understanding of the history, global spread, ecology, evolution, and management of the corn bacterial leaf streak pathogen, *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. **Phytopathology**, v. 110, n. 6, p. 1124-1131, 2020.

PASCHOLATI, S. F.; DALIO, R. J. D. Fisiologia do parasitismo: como as plantas se defendem dos patógenos. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 423-452.

PATAKY, J. K. Relationships between yield of sweet corn and northern leaf blight caused by *Exserohilum turcicum*. **Phytopathology**, v. 82, n. 3, p. 370-375, 1992.

PÉREZ, C. D. P.; POZZA, E. A.; POZZA, A. A. A.; FREITAS, A. S.; SILVA, M. G. Nitrogênio e potássio na intensidade da mancha aureolada do cafeeiro em solução nutritiva. **Coffee Science**, v. 12, n. 1, p. 60-68, 2017.

PLAZAS, M. C.; ROSSI, R. L.; BRÜCHER, E.; GUERRA, F. A.; VILARÓ, M. L.; GUERRA, G. D.; WU, G.; ORTIZ-CASTRO, M. C.; BRODERS, K. First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea mays*) in Argentina. **Plant Disease**, v. 102, n. 5, p. 1026, 2018.

REZENDE, C. C.; SILVA, M. A.; FRASCA, L. L. M.; FARIA, D. R.; FILIPPI, M. C. C.; LANNA, A. C.; NASCENTE, A. S. Microrganismos multifuncionais: utilização na agricultura. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. 1-15, 2021.

REZENDE, D. C.; BRANDÃO, D. F. R.; BRAND, S. C.; BLUMER, S.; PASCHOLATI, S. F.; MAFRA, N. M. Mecanismos de ação do fosfito de potássio no crescimento e desenvolvimento de *Phytophthora nicotianae*, agente causal da gomose em citros. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 10, p. 1-21, 2020.

REZENDE, J. A. M.; MASSOLA JÚNIOR, N. S.; BEDENDO, I. B. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 27-43.

RODRIGUES, V. W. B.; BUENO, T. V.; TEBALDI, N. D. Biofertilizantes no controle da mancha bacteriana (*Xanthomonas* spp.) do tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 1, p. 94-96, 2016.

RÖSLER, J.; KREKEL, F.; AMRHEIN, N.; SCHMIDT, J. Maize phenylalanine ammonia-lyase has tyrosine ammonia-lyase. **Plant Physiology**, v. 113, n. 1, p. 175-179, 1997.

SANTOS, L. A.; MAREK, J.; WERNER, L. C.; MARIANO, L. C.; FARIA, C. M. D. R. Sensibilidade micelial *in vitro* de *Cercospora beticola* ao oxiclreto de cobre. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 16, n. 2, p. 153-157, 2017.

SANTOS, L. O.; COSTA, V. S. O.; FREIRE, E. B.; BATISTA, D. C.; TERAPO, D.; BARBOSA, M. A. G. Inibição *in vitro* de *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* por indutores de resistência. In: V JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA EMBRAPA SEMIÁRIDO, 2010, Petrolina. **Anais...** Petrolina (PE): Embrapa Semiárido, 2010. p. 160-164.

SCHURT, D. A.; RODRIGUES, F. Á.; SOUZA, N. F. A.; REIS, R. D. Eficiência de diferentes moléculas na redução dos sintomas da queima das bainhas em arroz e no crescimento de *Rhizoctonia solani in vitro*. **Revista Ceres**, v. 60, n. 2, p. 221-225, 2013.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J. R.; CIA, P. (Eds). **Interação Planta Patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ, 2008, p. 227-248.

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

SHIOMI, H. F.; MELO, I. S.; MINHONI, M. T. A. Seleção de bactérias endofíticas com ação antagônica a fitopatógenos. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 4, p. 535-538, 2008.

SILVA JUNIOR, G. J.; BEHLAU, F. Controle químico. In: AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. (Eds). **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. Ouro Fino: Agronômica Ceres, 2018, p. 239-260.

SILVA, A.; SANTOS, I.; BALBINOT, A. L.; MATEI, G.; OLIVEIRA, P. H. Reação de genótipos de feijão ao crestamento bacteriano comum, avaliado por dois métodos de inoculação. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, n. especial, p. 2019-2024, 2009.

SILVA, É. O.; ALVES, E.; FERREIRA, T. C.; ALBUQUERQUE, C. A. C. Óleos essenciais no controle da pinta bacteriana e na ativação de respostas bioquímicas em tomateiro. **Summa Phytopathologica**, v. 43, n. 3, p. 212-217, 2017.

SILVEIRA, E. B.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. Severidade da mancha-aquosa em meloeiro sob diferentes condições de molhamento foliar e concentração de inóculo de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 2, p. 171-175, 2003.

SILVEIRA, N. S. S.; MICHEREFF, S. J.; MARIANO, R. L. R.; TAVARES, L. A.; MAIA, L. C. Influência da temperatura, período de molhamento e concentração do inóculo de fungos na incidência de podridões pós-colheita em frutos de tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2001.

SIQUEIRA, I. T. D.; CRUZ, L. R.; SOUZA-MOTTA, C. M.; MEDEIROS, E. V.; MOREIRA, K. A. Indução de resistência por acibenzolar-S-metil em feijão caupi no controle da antracnose. **Summa Phytopathologica**, v. 45, n. 1, p. 76-82, 2019.

SOBRINHO, G. G. R.; RODRIGUES, G. B.; SANTOS, A.; JESUS JUNIOR, W. C.; NOVAES, Q. S. Efeito de fosfito de potássio no crescimento e na densidade micelial

do *Fusarium solani* do maracujazeiro. **Summa Phytopathologica**, v. 42, n. 2, p. 180-182, 2016.

SOLTANI, J.; ALIABADI, A. A. Antibacterial effects of several plant extracts and essential oils on *Xanthomonas arboricola* pv. *juglandis* in vitro. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 461-468, 2013.

SOUZA, A. D.; ROGGERIO, T. U.; FURLAN, M. R.; AOYAMA, E. M. Óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia* Maiden & Betche, Cheel) no controle de cercosporiose em beterraba. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1078-1082, 2015.

SOUZA, J. O. G.; POZZA, E. A.; BELAN, L. L.; FREITAS, M. L. O.; OLIVEIRA, J. M. Initial stages of infectious process of *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* in coffee leaves. **Coffee Science**, v. 14, n. 3, p. 338-348, 2019.

STADNIK, M. J. Indução de resistência a oídios. **Summa Phytopathologica**, v. 26, n. 1, p. 175-177. 2000.

STANGARLIN, J. R.; KUHN, O. J.; TOLEDO, M. V.; PORTZ, R. L.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; PASCHOLATI, S. F. A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agrária Paranaensis**, v. 10, n. 1, p. 18-46, 2011.

STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F.; FRANZENER, G. Phenols,  $\beta$ -1,3 glucanase, chitinase and phenylalanine ammonia-lyase activities in infection sites of *Exserohilum turcicum* in maize genotypes. **Summa Phytopathologica**, v. 31, n. 3, p. 261-267, 2005.

STRAZZI, S. Derivados do milho são usados em mais de 150 diferentes produtos industriais. **Revista Visão Agrícola**, v. 13, p. 146-150, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. Nutrição Mineral. In: TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MØLLER, I. M.; MURPHY, A. (Eds). **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 119-142.

THIPYAPONG, P.; HUNT, M. D.; STEFFENS, J. C. Antisense down regulation of polyphenol oxidases results in enhanced disease susceptibility. **Planta**, v. 220, n. 1, p. 105-117, 2004.

TOILLIER, S. L.; IURKIV, L.; MEINERZ, C. C.; BALDO, M.; VIECELLI, C. A.; KUHN, O. J.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R. Controle de cretamento bacteriano comum (*Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*) e alterações bioquímicas em feijoeiro induzidas por *Pycnopus sanguineus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 1, p. 99-110, 2010.

UCHÔA, C. N.; POZZA, E. A.; UCHÔA, K. S. A.; RIBEIRO JÚNIOR, P. M.; TOYOTA, M.; MORAES, W. S.; FREITAS, M. L. O.; SILVA, B. M. Acibenzolar-S-Metil e silício como indutores de resistência à Sigatoka-negra em bananeira cultivar Grand Naine (AAA). **Agrarian**, v. 7, n. 24, p. 189-196, 2014.

UMESHA, S. Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, v. 34, n. 1, p. 68-71, 2006.

USDA. United States Department of Agriculture. **World Agricultural Production**. Foreign Agriculture Service. p. 29, june, 2021. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/production.pdf>>. Acesso em: 23 jun 2021.

VELOSO, R. A.; FERREIRA, T. P. S.; DEBONA, D.; AGUIAR, R. W. S.; CANGUSSU, A. S. R.; CHAGAS JÚNIOR, A. F.; SANTOS, G. R. Enzymatic activity in essential oil-treated and pathogen-inoculated corn plants. **Journal of Agricultural Science**, v. 10, n. 10, p. 171-177, 2018.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. **Molecular Plant Pathology**, v. 14, n. 1, p. 2-18, 2013.

VINCENT, M.; HARTEMANN, P.; ENGELS-DEUTSCH, M. Antimicrobial applications of copper. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 219, n. 7, p. 585-591, 2016.

VISHAKHA, K.; DAS, S.; DAS, S. K.; BANERJEE, S.; GANGULI, A. Antibacterial, anti-biofilm, and anti-virulence potential of tea tree oil against leaf blight pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* instigates disease suppression. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 19-32, 2022.

WORDELL FILHO, J. A.; STADNIK, M. J. Efeito de fosfitos de potássio e de manganês sobre o míldio da cebola. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 1, p. 84-87, 2010.

XIANG, L.; MOORE, B. S. Biochemical characterization of a prokaryotic phenylalanine ammonia lyase. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 12, p. 4286-4289, 2005.

ZACARONI, A. B. **Formulações à base de extratos vegetais combinados ou não com indutores e fertilizantes foliares no manejo de bacterioses do algodoeiro e do feijoeiro**. 2008. 80 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

ZAMBOLIM, L.; VENTURA, J. A. Resistência a doenças induzida pela nutrição mineral das plantas. In: LUZ, W. C.; FERNANDES, J. M.; PRESTES, A. M.; PICININI, E. C. (Eds). **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. Passo Fundo: RAPP, 1993, p. 275-318.

ZAMBOLIM, L.; COSTA, H.; VALE, F. X. R. Nutrição mineral e patógenos radiculares. In: MICHEREFF, S. J.; ANDRADE, D. E. G. T.; MENEZES, M. (Eds). **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Recife: UFRPE, 2005, p. 153-182.

ZÁMOCKÝ, M.; REGELSBERGER, G.; JAKOPITSCH, C.; OBINGER, C. The molecular peculiarities of catalase-peroxidases. **FEBS Letters**, v. 492, n. 3, p. 177-182, 2001.

ZERIOUH, H.; ROMERO, D.; GARCÍA-GUTIÉRREZ, L.; CAZORLA, F. M.; VICENTE, A.; PÉREZ-GARCÍA, A. The iturin-like lipopeptides are essential components in the biological control arsenal of *Bacillus subtilis* against bacterial diseases of cucurbits. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 24, n. 12, p. 1540-1552, 2011.