ASPECTOS DO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM PLANTAS DE MILHO
(*zea mays* L.), MANTIDAS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO,
PELO EMPREGO DE *Saccharomyces cerevisiae* MEYEN

SANDRA REGINA DA SILVA
Bióloga

Orientador: Prof. Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz", da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de
Mestre em Agronomia - Área de con-
centração: Fitopatologia.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1989

S586a Silva, Sandra Regina da
Aspecto do controle da antracnose em plantas
de milho (Zea mays L.), mantidas em casa-de-ve
getação, pelo emprego de Saccharomyces cerevi-
siae Meyen. Piracicaba, 1989.
81 p. ilus.

Diss.(Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Antracnose em milho - Controle biológico
2. Fungo fitopatogênico - Controle biológico 3.
Levedura para controle biológico 4. Milho - Doen
ça - Controle biológico I. Escola Superior de A
gricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 633.15

ASPECTOS DO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM PLANTAS DE MILHO
(*Zea mays* L.), MANTIDAS EM CASA-DE-VÊGETAÇÃO, PELO EMPREGO
DE *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. | .

Sandra Regina da Silva

Aprovada em: 12/09/1989

Comissão julgadora:

Prof. Dr. Eric Balmer

ESALQ/USP

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

ESALQ/USP

Prof. Dr. Alcides Serzedello

UNESP/Rio Claro

Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati

Orientador

Aos meus pais,
pelo carinho e apoio.

À minha irmã Sueli,
pela compreensão e amizade.

DEDICO.

Valeu a pena? Tudo vale a pena
se a alma não é pequena.

Quem quer passar além do Bojador
tem que passar além da dor.

Deus, ao mar o perigo e o abysmo deu
mas nelle é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

Nossos sinceros agradecimentos,

Ao Dr. SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI, da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico de São Paulo, pela orientação, apoio e incentivo dispensados à realização deste trabalho.

À amiga Bióloga ANA MARIA QUELJEIRO LOPEZ, da Seção de Bioquímica Fitopatológica, pelo apoio e colaboração prestada na revisão dos originais.

À Dra. WALKYRIA BUENO DE CAMARGO MORAES, Chefe da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico, pelo incentivo e sugestões dispensadas à realização deste trabalho.

À FLORINDA NAIDE MAGLIO e SILVANA D'AGOSTINI, da Seção de Desenho do Instituto Biológico de São Paulo, pela confecção das figuras.

Ao SÉRGIO VIANNA, da Seção de Fotomicrografia do Instituto Biológico, pelo auxílio prestado na confecção das fotos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao "Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit-GmBH" (GTZ), pelo auxílio financeiro.

Aos demais colegas da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico e a todos que, direta ou indiretamente, colaboraram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

Página

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xvi
LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS	xvii
RESUMO	xix
SUMMARY	xxi
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	06
2.1. Características da proteção induzida	07
2.2. Indução de proteção local ou sistêmica	09
2.3. Procedimentos usados para induzir proteção em plantas	10
2.3.1. Tratamento com microorganismos viáveis	10
2.3.2. Tratamento com microorganismos inativados	12
2.3.3. Tratamento com metabólitos ou componentes de microorganismos	13
2.3.4. Tratamentos com produtos microbianos disponíveis comercialmente	14
2.4. Mecanismos envolvidos na proteção induzida contra fungos	15
2.5. Viabilidade da proteção induzida no controle de doenças vegetais	18
2.6. Indução de proteção em gramíneas	19

3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Materiais	21
3.1.1. Planta	21
3.1.2. Fungos	21
3.2. Métodos	23
3.2.1. Cultivo do milho	23
3.2.2. Manutenção do fungo <i>C. graminicola</i> e obtenção de suspensões de conídios .	23
3.2.3. Obtenção das preparações de <i>S. cere-</i> <i>visiae</i>	24
3.2.3.1. Produto comercial	24
3.2.3.2. Filtrado do produto comercial	
3.2.3.3. Células lavadas	24
3.2.3.4. Células isoladas	25
3.2.3.5. Filtrado de células isoladas	26
3.2.3.6. Tratamento térmico das pre- parações de <i>S. cerevisiae</i> .	26
3.2.4. Tratamento das plantas com as prepa- rações e inoculação com <i>C. graminí-</i> <i>cola</i>	27
3.2.4.1. <i>C. graminicola</i> inoculado no mesmo local de aplicação das preparações de <i>S. cerevisiae</i> .	27
3.2.4.2. <i>C. graminicola</i> inoculado a distância do local de apli- cação das preparações de <i>S.</i> <i>cerevisiae</i>	28
3.2.5. Avaliação da proteção	29
3.2.5.1. Determinação do número de lesões nas folhas de milho.	30
3.2.5.2. Determinação da área foliar lesionada	31

3.2.5.3. Capacidade de esporulação do <i>C. graminicola</i> nas folhas de milho	32
3.2.6. Influência das preparações de <i>S. cerevisiae</i> no desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> "in vivo" e "in vitro"	33
3.2.6.1. Efeito das preparações de <i>S. cerevisiae</i> na germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. graminicola</i> em folhas de milho	33
3.2.6.2. Efeito das preparações de <i>S. cerevisiae</i> na germinação de <i>C. graminicola</i> "in vitro" ...	34
3.2.6.3. Efeito de células de <i>S. cerevisiae</i> no crescimento micelial de <i>C. graminicola</i> em meio de batata-dextrose-agar.	35
4. RESULTADOS	36
4.1. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de <i>S. cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial e submetidas ou não a tratamento térmico, sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> e a manifestação da antracnose em milho	36
4.1.1. Suspensões não submetidas a tratamento térmico	36
4.1.2. Suspensões submetidas a tratamento térmico	42

4.2. Influência do intervalo de tempo entre o tratamento das folhas com suspensões de <i>S. cerevisiae</i> , obtidas a partir do produto comercial, e a inoculação com <i>C. graminicola</i> sobre o desenvolvimento do patógeno e a manifestação da antracnose em milho	42
4.3. Efeito de diferentes preparações de <i>S. cerevisiae</i> , submetidas ou não a tratamento térmico, sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> e a manifestação da antracnose em milho	45
4.3.1. Preparações não submetidas a tratamento térmico	48
4.3.2. Preparações submetidas a tratamento térmico	48
4.4. Influência das preparações de <i>S. cerevisiae</i> , quando aplicadas a distância do sítio de inoculação do patógeno, sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> e a manifestação da antracnose em milho	51
4.4.1. Preparações aplicadas na 4ª folha e conídios de <i>C. graminicola</i> inoculados na 5ª folha	51
4.4.2. Preparações aplicadas na 5ª folha e conídios de <i>C. graminicola</i> inoculados na 4ª folha	51
4.5. Efeito das preparações de <i>S. cerevisiae</i> sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> "in vitro"	56
4.5.1. Efeito na germinação de conídios de <i>C. graminicola</i> "in vitro"	56
4.5.2. Efeito de células de <i>S. cerevisiae</i> , isoladas a partir do "Fermento Biológico Fresco", sobre o crescimento micelial de <i>C. graminicola</i> em meio de batata-dextrose-ágar	56

5. DISCUSSÃO	59
5.1. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de <i>S. cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial e submetidas ou não a tratamento térmico, sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> e a manifestação da antracnose em milho	59
5.2. Influência do intervalo de tempo entre o tratamento das folhas com suspensões de <i>S. cerevisiae</i> e a inoculação com <i>C. graminicola</i> sobre o desenvolvimento do patógeno e a manifestação da antracnose em milho	62
5.3. Efeito de diferentes preparações de células de <i>S. cerevisiae</i> , submetidas ou não a tratamento térmico, sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> e a manifestação da antracnose em milho	62
5.4. Influência das preparações de <i>S. cerevisiae</i> aplicadas a distância do ponto de inoculação do patógeno sobre o desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> e a manifestação da antracnose em milho	65
5.5. Efeito das preparações de <i>S. cerevisiae</i> no desenvolvimento de <i>C. graminicola</i> "in vitro"	66
5.6. Considerações finais	66
6. CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

LISTA DE FIGURAS

FIGURA Nº		Página
01	Diagrama de uma folha de milho ilustrando os segmentos foliares	30
02	Influência de diferentes concentrações de suspensões de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ("Fermento Biológico Fresco") na manifestação dos sintomas induzidos por <i>Colletotrichum graminicola</i> em folhas de milho	40
03	Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial, na germinação e formação de apressórios por conídios de <i>Colletotrichum graminicola</i> (A) e na redução da antracnose em folhas de plantas de milho (B)	41
04	Efeito de diferentes preparações de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , submetidas ou não ao tratamento térmico, sobre a germinação (A) e a formação de apressórios (B) por conídios de <i>Colletotrichum graminicola</i> inoculados em folhas de plantas de milho. Tratamentos efetuados 24h antes da inoculação com <i>C. graminicola</i> (5×10^5 conídios/ml)	49

FIGURA Nº

Página

- 05 Efeito de diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ou não a tratamento térmico, sobre a manifestação da antracnose em folhas de milho. (A) área lesionada; (B) número de lesões/cm². Tratamentos efetuados 24h antes da inoculação com *Colletotrichum graminicola* ... 50
- 06 Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância do sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola*, na germinação (A) e na formação de apressórios (B) por conídios de *C. graminicola* em folhas de milho. Preparações aspergidas sobre a 4ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* na 5ª folha 52
- 07 Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância no sítio de inoculação de *Colletotrichum graminicola*, na manifestação da antracnose em folhas de milho. (A) área lesionada; (B) número médio de lesões/cm²; (C) número médio de conídios/cm². Preparações aspergidas sobre a 4ª folha 24 h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml) na 5ª folha 53

FIGURA Nº

Página

- 08 Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância no sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola*, na germinação (A) e na formação de apressórios (B) por conídios de *C. graminicola* em folhas de milho. Preparações aspergidas sobre a 5ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* na 4ª folha 54
- 09 Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância do sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola* na manifestação da antracnose em folhas de milho. (A) área lesionada; (B) número de lesões/cm²; (C) número médio de conídios/cm². Preparações aspergidas sobre a 5ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* (5x10⁵ conídios/ml) na 4ª folha 55
- 10 Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ou não a tratamento térmico, na germinação dos conídios de *Colletotrichum graminicola* "in vitro"..Gotículas (20 µl) contendo as preparações e conídios dispostas sobre lâminas de microscopia 57

11	Influência de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , isoladas a partir do "Fimento Biológico Fresco", sobre o crescimento micelial de <i>Colletotrichum graminicola</i> em meio de batata-dextrose-ágar. <i>S. cerevisiae</i> repicada em risca no meio de batata-dextrose-ágar 3 dias antes da colocação do disco contendo micélio de <i>C. graminicola</i> . Placas mantidas sob condições de luz ou escuro	58
----	---	----

LISTA DE TABELAS

TABELA N°		Página
01	Características do "Fermento Biológico Fresco Fleischmann"	22
02	Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial, na germinação e formação de apressórios por conídios de <i>Colletotrichum graminicola</i> inoculados em folhas de milho	37
03	Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial, na manifestação da antracnose em folhas de milho	38
04	Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células autoclavadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial, na germinação e formação de apressórios por conídios de <i>Colletotrichum graminicola</i> inoculados em folhas de milho	43
05	Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células autoclavadas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , preparadas a partir do produto comercial, na manifestação da antracnose em folhas de milho	44

TABELA Nº

Página

06	Influência do intervalo de tempo entre o tratamento das folhas de milho com suspensões de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a inoculação com <i>Colletotrichum graminicola</i> na germinação e formação de apressórios por conídios de <i>C. graminicola</i>	46
07	Influência do intervalo de tempo entre o tratamento das folhas de milho com suspensões de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e a inoculação com <i>Colletotrichum graminicola</i> na manifestação da antracnose em milho	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

BDA	-	batata-dextrose-ágar
CIS	-	células isoladas
CLA	-	células do fermento lavadas
FCI	-	filtrado de células isoladas
FER	-	fermento biológico
FIL	-	filtrado do fermento
TRIS	-	tris-hidroxi-amino-metano
v/v	-	volume/volume

LISTA DE PLANTAS E MICROORGANISMOS CITADOS

PLANTAS

<u>Nome Científico</u>	<u>Nome vulgar</u>
<i>Avena sativa</i> L.	aveia
<i>Chrysanthemum leucanthemum</i> L.	margarida-do-campo
<i>Coffea arabica</i> L.	cafeeiro
<i>Cucumis melo</i> L.	melão
<i>Cucumis sativus</i> L.	pepino
<i>Glycine max</i> L.	soja
<i>Hordeum vulgare</i> L.	cevada
<i>Medicago sativa</i> L.	alfafa
<i>Nicotiana tabacum</i> L.	fumo
<i>Oriza sativa</i> L.	arroz
<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	feijão
<i>Rosa</i> spp.	roseira
<i>Solanum tuberosum</i> L.	batata
<i>Triticum aestivum</i> L.	trigo
<i>Zea mays</i> L.	milho

MICROORGANISMOS

Agrobacterium tumefaciens (Smith & Townsend) Conn
Alcaligena faecalis Castelani & Chalmers
Bacillus megaterium de Bary
Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn
Bacillus thuringiensis Berliner
Cladosporium cucumerinum Ell. & Arth.
Colletotrichum graminicola (Ces.) Wils.
Colletotrichum lagenarium (Pass.) Ell & Halst.
Corynebacterium insidiosum (McCull) H.L.
Cryptococcus laurentii var. *flavescens* Loder & Van Rij

- Erysiphe graminis* DC.
Erysiphe graminis f.sp. *hordei* Marchal
Erysiphe graminis f.sp. *tritici* Marchal
Helminthosporium carbonum Ullstrup
Helminthosporium maydis Nisik. & Miy.
Helminthosporium victoria Meehan & Murphy
Hemileia vastatrix (Berk. & Br.)
Mycosphaerella melonis (Pass.) Chiu & Walker
Peronospora hyoscyami f.sp. *tabacina* Adam
Phytophthora infestans (Mont) de By
Phytophthora megasperma Drechsler
Pseudomonas lachrymans (Sm. & Bryan) Carsner
Pseudomonas rubrilineans (Lee & Al.) Stapp
Pseudomonas solanacearum (Smith) Dows
Pseudomonas tabaci (Wolf & Foster) Stevens
Puccinia graminis f.sp. *tritici* Pers.
Puccinia coronata Cda. var. *avenae* Fraser et Ledingham
Puccinia psidii Wint
Puccinia recondita Rob. ex Desm. f.sp. *tritici* (Eriis) Carleton
Puccinia oxalidis Dietel & Ellis
Saccharomyces cerevisiae Meyen
Sphaerotheca fuliginea (Sch. Pellaci)
Sporobolomyces roseus Kluyver & Van Niel
Tranzschelia pruni-spinosae (Pers.) Dietel var. *discolor*
(Fueckel) Dunegan
Trichoderma viride Persoon ex Fries
Uromyces phaseoli (Rehen) Wint.
Ustilago maydis (DC) Cda.
Xanthomonas manihotis (Arthaud-Berthet)

ASPECTOS DO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM PLANTAS DE MILHO
(*Zea mays* L.), MANTIDAS EM CASA-DE-VEGETAÇÃO,
PELO EMPREGO DE *Saccharomyces cerevisiae* Meyen.

Autora: SANDRA REGINA DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

RESUMO

O trabalho foi desenvolvido com o intuito de se estudar a possibilidade da proteção de folhas de plantas de milho contra *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose, pelo emprego de aspersões prévias ou simultâneas a inoculação com o patógeno, de suspensões ou filtrados de células de *Saccharomyces cerevisiae*, obtidos a partir do produto comercial "Fermento Biológico Fresco Fleischmann". Os parâmetros avaliados no trabalho envolveram a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* bem como a área foliar lesionada, número de lesões e capacidade de esporulação do fungo nos tecidos.

Suspensões de células lavadas ou não de *S. cerevisiae* e filtrados dessas suspensões, obtidas a partir do produto comercial, reduziram o desenvolvimento de *C. graminicola* bem como a manifestação da antracnose nas folhas de milho previamente ou concomitantemente tratadas com as mesmas.

Da mesma forma, suspensões de células de *S. cerevisiae* e o filtrado dessas suspensões de células, isoladas a partir do produto comercial e mantidas em meio de batata-dextrose-ágar, também inibiram o desenvolvimento de *C. graminicola* e a expressão da antracnose.

As diferentes preparações de células e seus respectivos filtrados, os quais alteraram o desenvolvimento do patógeno e a manifestação da antracnose nas folhas, mostraram-se termolábeis.

A redução do desenvolvimento de *C. graminicola* e da expressão da doença pela utilização de filtrados de suspensões de *S. cerevisiae* revelou que a presença física das células de levedura não era necessária para a proteção das folhas. Portanto, um metabólito ou complexo de metabólitos termolábil pode ser liberado nos filtrados. Experimentos "in vitro" mostraram que *S. cerevisiae* aparentemente possui uma ação antagônica sobre *C. graminicola* devido a antibiose.

Finalmente, os resultados também evidenciaram que a proteção das folhas contra *C. graminicola*, a partir do tratamento com as preparações de *S. cerevisiae*, não ocorre a distância de seu sítio de aplicação e portanto, não se mostra sistêmica. Porém, os resultados não descartam a possibilidade da indução de proteção local nas folhas tratadas com as diferentes preparações.

SOME ASPECTS ON THE CONTROL OF ANTHRACNOSE IN MAIZE PLANTS
(*Zea mays* L.), GROWN UNDER GREENHOUSE CONDITIONS, BY USING
THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* Meyen

Author: SANDRA REGINA DA SILVA

Adviser: Prof. Dr. SERGIO FLORENTINO PASCHOLATI

SUMMARY

This research was carried out to study the possible protection of corn leaves against *Colletotrichum graminicola*, the causal agent of anthracnose, by previous or simultaneous applications of suspensions or filtrates of *Saccharomyces cerevisiae*, obtained from baker's yeast called "Fermento Biológico Fresco" and produced by "Fleischmann Royal Produtos Alimentícios Ltda., Jundiaí, S.P., Brazil". The parameters evaluated involved conidium germination and apressorium formation by *C. graminicola* as well as lesioned leaf area, number of lesions and sporulation capacity of the fungus on the leaves.

Suspensions from washed or non-washed *S. cerevisiae* cells and filtrates of these suspensions, obtained from "Fermento Biológico Fresco", reduced the development of *C. graminicola* as well as the expression of anthracnose on the corn leaves when the leaves were previously or concomitantly treated with these preparations.

In the same way, when cells of *S. cerevisiae* were isolated from "Fermento Biológico Fresco", and grown in potato-dextrose-agar medium, the cell suspensions and their filtrates were also able to reduce the development of *C. graminicola* and the expression of the disease on the leaves.

The different cell preparations and their filtrates, which were able to alter the development of *C. graminicola* and the disease expression, were shown to be thermolabile.

The reduction on the development of *C. graminicola* and on disease expression on the leaves, when filtrates of cell suspensions of *S. cerevisiae* were used, suggest that the presence of the yeast cells is not necessary to protect the leaves. Therefore, a thermolabile substance or a complex of substances can be released from the cells into the filtrates. "In vitro" experiments showed that *S. cerevisiae* cells exhibit an possible antagonistic activity against *C. graminicola* due to antibiosis.

Finally, the results also showed that the protection of the corn leaves against *C. graminicola* did not occur at a distance from the site where the suspensions and filtrates were applied. Thus, this protection is not systemic and the occurrence of local protection on leaves treated with the different preparations is not rejected.

1. INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays* L.), juntamente com o arroz (*Oryza sativa* L.) e o trigo (*Triticum aestivum* L.) representam as três culturas de cereais mais importantes em todo o mundo (SHURTLEFF, 1980). Em consequência de sua crescente importância como fonte de alimento, a produção mundial do milho tem apresentado um avanço anual, tanto em área cultivada como em volume de produção e no rendimento por unidade de área.

No Brasil, apesar da tecnologia disponível, os índices médios de produtividade do milho situam-se, atualmente, ao redor de 25 milhões de toneladas com um rendimento de 1.898 kg/ha (I.E.A., 1988). Uma das razões dessa baixa produtividade é a ocorrência de doenças como as ferrugens, os carvões, os míldios, a maioria das podridões, manchas das folhas, etc. Os fungos são responsáveis pela maior parte das doenças do milho (SHURTLEFF, 1980).

Entre as doenças fúngicas que ocorrem no milho, a antracnose causada por *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils., tem se mostrado importante nos E.U.A. desde 1971 (NI

CHOLSON & WARREN, 1976). Com uma perda acentuada na produção, o problema tem atraído a atenção de melhoristas e produtores de sementes de milho (CARSON & HOOKER, 1981). Em nosso país, a antracnose tem sido considerada uma doença de pouca importância econômica, embora cause danos em culturas desenvolvidas em certas regiões onde prevalecem condições de temperatura e umidade elevadas. No caso específico do estado de São Paulo, essa doença foi relatada pela primeira vez, em Campinas, por SILVEIRA et alii (1965).

Os sintomas da doença podem ocorrer em qualquer parte da folha, caracterizando-se por lesões necróticas que podem alcançar até 15 mm de comprimento. Na nervura principal da folha, podem ocorrer lesões necróticas que se caracterizam por seu aspecto marrom e formato alongado. Os sintomas nas folhas inferiores ocorrem frequentemente no início da estação chuvosa e, nas superiores se manifestam no final desse período. As folhas infectadas apresentam-se com aspecto de murcha e morrem dentro de poucos dias. Os corpos de frutificação do fungo, acérvulos com setas características, podem se desenvolver em abundância nos tecidos necrosados. Sob condições climáticas de temperatura elevada e períodos longos de chuva, estes produzem uma massa rósea de conídios. O fungo pode também causar severa podridão do colmo (SHURTLEFF, 1980).

C. graminicola apresenta como estrutura característica para a sua identificação a formação de conídios em

acérvulos. Esses corpos de frutificação, com coloração marrom e formato circular, são facilmente observados quando o fungo é cultivado em meios sólidos adequados ou quando as folhas lesionadas são mantidas em condições de alta umidade. O fungo mantido em meio de batata-dextrose-ágar apresenta-se com micélio pouco ramificado, hialino e granular. Os conidióforos produzidos nos acérvulos são retos, hialinos, não septados, não ramificados e curtos ($1,6 - 3,3 \mu\text{m} \times 4,9 - 13,3 \mu\text{m}$). As setas são septadas, longas, de coloração marrom escura e são produzidas entre os conidióforos. Os conídios ($4,9 - 5,2 \mu\text{m} \times 26,1 - 30,8 \mu\text{m}$) são hialinos, não septados, falcados e surgem nas pontas dos conidióforos (BALMER & PEREIRA, 1987).

Os conídios do fungo podem ser disseminados pelo vento ou por respingos de chuva para folhas, onde a penetração ocorre através da epiderme ou estômatos. A presença de água mostra-se necessária para a germinação dos conídios. A doença se desenvolve melhor em tecidos mais velhos, entretanto, plântulas podem ser infectadas (JAMIL & NICHOLSON, 1987).

Dentre as medidas de controle para a antracnose, citam-se: o uso de híbridos e variedades resistentes; a rotação de cultura; a destruição de restos de cultura e a manutenção de fertilidade adequada do solo (SHURTLEFF, 1980).

Devido ao elevado custo dos insumos modernos

e a falta de estudos sobre práticas alternativas, novas medidas de controle para as doenças fúngicas em milho devem ser encontradas (SÃO PAULO, 1985). Segundo KUČ (1977) e SEQUEIRA (1983), a ativação de mecanismos de resistência nas plantas, a despeito das limitações existentes, pode constituir em método prático para o controle das doenças vegetais. Assim, a possibilidade de se usar a indução de proteção como uma medida de controle alternativo contra as doenças tem, nos últimos anos, chamado a atenção de um grande número de pesquisadores (BELL, 1981; SEQUEIRA, 1983; MARTINS et alii, 1985; KUČ, 1985; PASCHOLATI et alii, 1986; DEAN & KUČ, 1986a e KUČ, 1987).

A indução de proteção em plantas, comumente descrita como proteção cruzada, indução de resistência, proteção induzida, imunidade adquirida ou resistência induzida, pode ser definida como uma resistência dinâmica baseada nas barreiras físicas e químicas induzidas por inoculação prévia ou concomitante com um patógeno incompatível, não patógeno ou por tratamentos com os seus produtos metabólicos (SEQUEIRA, 1983). Em um sentido amplo, ela também pode ser ocasionada por estímulos abióticos.

Na indução de proteção, os agentes bióticos (microorganismos ou seus metabolitos) ou abióticos (fatores físicos ou químicos) utilizados para o tratamento prévio ou concomitante são denominados indutores. Tais indutores atuam inespecificamente sobre as plantas e estimulam os mecanismos bioquímicos de

resposta das mesmas, visando bloquear o desenvolvimento do patógeno em alguma fase de seu ciclo no hospedeiro (KUČ, 1987).

É comum em diferentes sistemas hospedeiro-patógeno a indução de proteção sistêmica, a qual se difunde através da planta a partir do ponto de indução (ROSS, 1961, 1965; KLEMENT & GOODMAN, 1968 e HAMMERSCHMIDT et alii, 1976). Por outro lado, a indução de proteção pode ser localizada, isto é, pode ser detectada somente na área imediatamente adjacente ao ponto de penetração do patógeno (ELLISTON et alii, 1971, 1977). Além disso, uma das características da proteção induzida é a sua dependência de um intervalo de tempo entre a aplicação inicial do indutor e a inoculação subsequente com o patógeno (LOVREKOVICH & FARKAS, 1965; GOODMAN, 1967).

A possibilidade da indução de proteção em plantas de milho contra fitopatógenos, portanto, desperta grande interesse, visto se constituir em medida alternativa para o controle de doenças. Esse método oferece algumas vantagens sobre os outros tipos de controle, como a não utilização de agrotóxicos e o aparente baixo custo operacional.

Com base no exposto, o presente trabalho foi desenvolvido com o intuito de se estudar a indução de proteção em milho contra *C. graminícola* pelo emprego de tratamentos prévios com suspensões e filtrados de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, obtidas a partir do produto comercial "Fermento Biológico Fresco Fleischmann".

2. REVISÃO DE LITERATURA

Tanto as plantas como os animais possuem mecanismos altamente efetivos para resistência às doenças, o que tem contribuído para a sobrevivência, dentro da pressão de seleção evolutiva. Por muitos anos, os fitopatologistas tem estudado a possibilidade da "imunização" de plantas por procedimentos similares aos estudados para animais. Dentre os primeiros trabalhos conduzidos, SMITH et alii (1911) relataram que margaridas do campo (*Chrysanthemum leucanthemum* L.), inoculadas com *Agrobacterium tumefaciens* (Smith & Townsend) Conn., tornavam-se "imunes" a inoculação subsequente com a mesma bactéria. Em 1923, BROWN inoculou margaridas do campo e rosas (*Rosa* spp) com células mortas de *A. tumefaciens* e observou que as plantas inoculadas com tais células não formavam tumores quando inoculadas 24 horas mais tarde, no mesmo local com células vivas da bactéria. Porém, o que ocorria nas plantas era muito diferente das reações antígeno-anticorpo em animais, fato que gerou um certo desinteresse pela "imunização" em plantas contra fitopatógenos. O entusiasmo, entretanto, ressurgiu com a demonstração da "prote

ção cruzada" em plantas contra doenças causadas por vírus (McKINNEY, 1929) e do acúmulo de fitoalexinas em tecidos vegetais em resposta a infecção por fungos (MÜLLER & BÖRGER, 1940).

2.1. CARACTERÍSTICAS DA PROTEÇÃO INDUZIDA

A proteção induzida é dependente do intervalo de tempo entre o tratamento inicial (indutor) e a inoculação do patógeno. Com qualquer sistema empregado a proteção não é imediata, mas pode ser demonstrada somente após um período adequado. Esta dependência de tempo indica que mudanças específicas no hospedeiro, envolvendo a síntese ou acúmulo de metabolitos, são importantes no fenômeno de resistência induzida. O período necessário para o início da resposta de proteção está relacionado com a concentração tanto do indutor como do patógeno. Em plantas de fumo (*Nicotiana tabacum* L.), a infiltração de suspensões aquosas de células de *Pseudomonas tabaci* (Wolf & Foster) Stevens termicamente inativadas, nas concentrações de 10^5 e 10^7 células/ml, resultou em uma proteção parcial contra células vivas da mesma bactéria. Porém, na concentração de 10^9 células/ml a proteção mostrou-se completa (LOVREKOVICH & FARKAS, 1965).

Uma vez que as respostas protetoras envolvem a síntese e/ou movimento de metabólitos, e

que estes são originários de processos que requerem energia, pode-se supor que a luz seja um requisito absoluto em vários sistemas. LOZANO & SEQUEIRA (1970) trabalhando com folhas de fumo demonstraram que quando as folhas eram infiltradas com células de *Pseudomonas solanacearum* (Smith) Dows termicamente inativadas, a luz era necessária para a manifestação da proteção. Entretanto, folhas de alfafa (*Medicago sativa* L.) inoculadas com mutantes de *Corynebacterium insidiosum* (McCull) H.L., mostraram maior resistência às estirpes virulentas quando mantidas no escuro por 24 horas antes da inoculação do patógeno (CARROL & LUKEZIC, 1972).

As respostas de proteção induzida por prévia inoculação também parecem ser sensíveis à temperatura. A resistência que se desenvolve em plantas de fumo como resultado da formação de lesão local por estirpes de vírus do mosaico do fumo (TMV) ocorre em plantas crescidas a 20-24°C, mas não ocorre em plantas crescidas a 30°C (KLEMENT & GOODMAN, 1967).

Uma das características mais marcantes do fenômeno da proteção induzida é a duração do efeito protetor ocasionado pela inoculação indutora. Em plantas de pepino (*Cucumis sativus* L.) inoculadas repetidamente com *Colletotrichum lagenarium* (Pass.) Ell & Halst., a resposta de proteção contra o mesmo fungo permaneceu viável por 10 semanas (KUČ et alii, 1975).

A ausência de especificidade de respostas pro

tetoras em plantas é refletida não somente pelos diferentes organismos que induzem a resposta (indutores), mas também no amplo espectro de fitopatógenos contra os quais a planta é protegida (SEQUEIRA, 1983). De acordo com DEAN & KUČ (1986a), o tratamento indutor da folha primária de plantas de pepino com suspensões de *C. lagenarium* permite uma proteção sistêmica contra pelo menos 13 fitopatógenos, incluindo fungos, bactérias e vírus.

Uma outra característica da proteção induzida é a possibilidade de sua transmissão através da enxertia. JENNS & KUČ (1979) demonstraram que em plantas de pepino a transmissão da proteção induzida ocorria do porta enxerto tratado para o enxerto. Os experimentos com enxertia sugerem que um "sinal" químico é produzido no local da indução e, então, é translocado para outros tecidos onde condiciona a proteção (DEAN & KUČ, 1986b).

2.2. INDUÇÃO DE PROTEÇÃO LOCAL OU SISTÊMICA

A proteção induzida pode se manifestar local ou sistemicamente a distância do ponto de aplicação do indutor e penetração do patógeno. Como exemplo, podemos citar a indução de proteção local em folhas de plantas de melão (*Cucumis melo* L. contra *Mycosphaerella melonis* (Pass.) Chiu & Walker, através do uso do não patógeno *Helminthosporium car-*

bonum Ullstrup ou do próprio patógeno inativado (PASCHOLATI et alii, 1986).

A proteção induzida sistemicamente ocorre no hospedeiro em locais distantes do ponto de aplicação do indutor. Por exemplo, em plântulas de pepino, JENNS et alii (1979) verificaram que as mesmas exibiam resistência ao vírus da necrose do fumo (TNV) nas segundas folhas (a partir da base) caso as primeiras folhas fossem inoculadas com TNV, *C. lagenarium*, ou *Pseudomonas lachrymans* (Sm. & Bryan) Carsoner. O intervalo entre o tratamento indutor e a inoculação com o patógeno foi de 7 dias. A resistência manifestou-se pela redução do número de lesões nas segundas folhas 6 dias após a inoculação com o vírus. Trabalhos realizados por GUEDES et alii (1980) mostraram que o efeito da proteção induzida nas plantas de pepino contra *C. lagenarium* era mais acentuado acima da folha induzida do que abaixo desta. JENNS & KUČ (1979) demonstraram, ainda, que ocorria transmissão da proteção induzida nessas plantas contra a antracnose através de enxertia do porta enxerto protegido para o enxerto, sugerindo-se, então, que um "sinal" químico podia ser produzido no local da indução e ser translocado para outros tecidos, onde ele condicionaria a resistência.

2.3. PROCEDIMENTOS USADOS PARA INDUZIR PROTEÇÃO EM PLANTAS

2.3.1. Tratamentos com microorganismos viáveis

O tratamento indutor pode envolver o uso do

próprio patógeno, formas avirulentas do patógeno bem como outros patógenos, não patógenos ou saprófitas (SEQUEIRA, 1979). CARUSO & KUČ (1979), utilizando-se dos próprios patógenos como indutores, *C. lagenarium* e *P. lachrymans*, demonstraram que plantas de pepino podiam ser protegidas sistemicamente contra os mesmos ainda que num intervalo de 72 a 96 horas entre o tratamento indutor e a inoculação propriamente dita. Em plantas de fumo, CRUICKSHANK & MANDRYK (1960), através de experimentos realizados em casa-de-vegetação e campo, demonstraram, pela primeira vez, que o tratamento do caule dessas plantas com *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina* Adam. reduzia a severidade da doença em folhas subsequentemente inoculadas com o mesmo fungo. Nos E.U.A., a epidemia do míldio em plantas de fumo durante 1979 estimulou COHEN & KUČ (1981) a estudarem a indução de proteção nas mesmas. Os autores observaram que conídios de *P. tabacina* aplicados na base do caule de plantas de fumo induziam proteção sistêmica nas folhas contra o mesmo fungo. Foram necessárias duas semanas entre as inoculações para que uma proteção em torno de 50% fosse alcançada e três semanas para uma proteção em torno de 95%.

Microorganismos não patogênicos também podem induzir resistência nas plantas. MARTINS et alii (1985) mostraram que suspensões de esporos de *Puccinia psidii* Wint, *Puccinia oxalidis* Dietel & Ellis, *Tranzschelia pruni - spinosae* (Pers.) Dietel var. *discolor* (Fueckel) Dunegan, *Ustilago maydis* (DC) Cda., *H. carbonum* e *M. melonis*, quando pulverizadas

sobre as folhas de cafeeiros (*Coffea arabica* L.) cv. Mundo Novo 72 horas antes da inoculação com *Hemileia vastatrix* (Berk & Br.), agente causal da ferrugem alaranjada das folhas, induziam naquelas uma resposta protetiva evidenciada pela redução do número de lesões formadas em consequência da inoculação. Resultados semelhantes foram obtidos quando se empregaram como indutores suspensões de células de *Bacillus megaterium* de Bary, *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn, *Alcaligena faecalis* Castelani & Chalmers, *Xanthomonas manihotis* (Arthaud-Berthet) Starr e *Pseudomonas rubrilineans* (Lee et al.) Stapp. Os autores também evidenciaram a redução do tempo requerido para a esporulação do patógeno nas folhas.

2.3.2. Tratamento com microorganismos inativados

Microorganismos modificados por meio de tratamento térmico, químico, etc., também induzem resistência em plantas. LOZANO & SEQUEIRA (1970) mostraram que plantas de fumo podiam ser protegidas contra *P. solanacearum* quando células termicamente inativadas dessas bactérias eram infiltradas nas folhas de tais plantas. No sistema café - *H. vastatrix*, MORAES et alii (1976) e BERETTA et alii (1977) demonstraram que plantas de café suscetíveis à ferrugem, quando submetidas ao tratamento prévio com suspensões de uredíniosporos do patógeno termicamente inativados, adquiriam resistência contra subsequente inoculação com *H. vastatrix*. Segundo es-

ses autores, a proteção induzida nas plantas de café ocorria não só de forma localizada como também a distância do ponto de aplicação do indutor. PASCHOLATI et alii (1986) trabalhando com plantas de melão e o fungo *M. melonis*, agente causal da "podridão do caule", verificaram que inoculações prévias com *M. melonis*, termicamente inativado, tornavam essas plantas resistentes ao patógeno.

Por outro lado, em alguns sistemas os microorganismos inativados mostram-se ineficazes como indutores de resistência. CARUSO & KUČ (1979) demonstraram que esporos ou células, respectivamente de *C. lagenarium* e *P. lachrymans*, termicamente inativados, não foram efetivos como indutores de resistência em folhas de pepino contra a antracnose e a mancha angular. Segundo, COHEN & KUČ (1981) este tipo de resposta evidencia a necessidade da presença viva do indutor na interação, causando uma "irritação contínua" e lenta que ativa os mecanismos de defesa do hospedeiro.

2.3.3. Tratamento com metabolitos ou componentes de microorganismos

A indução de proteção em plantas, também, pode ser obtida por tratamento com metabólitos ou componentes do próprio patógeno. Por exemplo, MARTINS et alii (1985) mostraram que filtrados da água de lavagem de uredíniosporos de *H. vastatrix* autoclavados ou não tiveram um efeito indutor,

reduzindo o número de lesões em plantas de café inoculadas com essa ferrugem. As mesmas preparações foram ativas na indução de proteção em plantas de trigo (*Triticum aestivum* L.) e de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) posteriormente inoculadas respectivamente com *Puccinia graminis* f.sp. *tritici* Pers. e *Uromyces phaseoli* (Rehm) Wint. Os autores também concluíram que, nesse caso, o indutor seria uma substância extracelular liberada na água e não-específica quanto a sua capacidade de induzir proteção em plantas.

Por outro lado, DOKE et alii (1987) relataram que plantas de batata (*Solanum tuberosum* L.), cujas folhas foram previamente tratadas, através de fricção com carborundum, com componentes da parede celular do fungo *Phytophthora infestans* (Mont) de By, adquiriram resistência sistêmica contra *P. infestans*. A proteção foi evidenciada na redução da germinação dos zoosporos e da penetração do fungo no hospedeiro, persistindo em torno de 1 a 20 dias após o tratamento indutor. Os resultados sugeriram que os tecidos de plantas de batata, reagindo localmente aos componentes da parede do fungo, podem fornecer alguma "informação sistêmica" que ativa ou aumenta a resistência dos tecidos a *P. infestans*.

2.3.4. Tratamento com produtos microbianos disponíveis comercialmente

Plantas de café suscetíveis, cv. Mundo Novo, tratadas com suspensões de *Bacillus thuringiensis* Berliner ou

com produtos comerciais (Thuricide HD, Bactimos e Bactospeine PM) a base desse microrganismo, foram protegidas contra o fungo *H. vastatrix* (ROVERATTI et alii, 1989). Nas concentrações acima de 20 mg/ml, a proteção local causada por Bactimos, Bactospeine PM, Thuricide HD, células de *B. thuringiensis* industrialmente liofilizadas e a suspensão de células do bacilo crescido em meio de cultura situou-se em torno de 80 a 95%. Thuricide HD mostrou-se efetivo como indutor de proteção nas concentrações de 5 a 20 mg/ml. A proteção nas plantas de café foi determinada pela redução do número médio de lesões por folha nas plantas tratadas com o indutor comparativamente às plantas tratadas com água. Além disso, ocorreu um decréscimo no tamanho das lesões bem como um atraso no tempo de esporulação do fungo nas plantas submetidas a pulverização com Thuricide HD. De acordo com ROVERATTI et alii (1989), as formulações comerciais à base de *B. thuringiensis* e as suspensões de suas células foram efetivas na indução de proteção em plantas de café contra *H. vastatrix*, sugerindo que os custos de produção do café podem ser reduzidos significativamente com o uso de tais microorganismos em um programa integrado para o controle de doenças.

2.4. MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PROTEÇÃO INDUZIDA CONTRA FUNGOS

Vários trabalhos tem demonstrado o acúmulo de

certos compostos em tecidos protegidos, com etileno, aglutininas, fitoalexinas, inibidores protéicos, compostos ricos em hidroxiprolina, etc., porém o envolvimento desses compostos na proteção induzida permanece obscuro (SEQUEIRA, 1983). Ênfase tem sido dado ao estudo de enzimas chaves ligadas a diferentes caminhos metabólicos bem como ao papel da lignificação na proteção induzida.

Na indução de proteção de plantas ocorre um aumento na atividade de enzimas consideradas importantes no metabolismo. Por exemplo, HAMMERSCHMIDT (1980) demonstrou que após a inoculação de plantas de pepino com *Cladosporium cucumerinum* Ell. et Arth. ou *C. lagenarium*, ocorria um aumento rápido na atividade da peroxidase nas plantas previamente protegidas. A enzima peroxidase mostra-se como componente importante no mecanismo envolvido na contenção dos patógenos nas plantas protegidas (KUČ, 1982). No caso de plantas de pepino, das enzimas estudadas, fenilalanina amônia-lia-se, ligase dos ácidos hidroxicinâmicos, etc..., somente o aumento na atividade da peroxidase ocorre paralelamente ao início da proteção e aumento da lignificação nas plantas protegidas e subsequentemente inoculadas com os patógenos (HAMMERSCHMIDT, 1980 e HAMMERSCHMIDT & KUČ, 1980).

A lignificação, por sua vez, consiste em um dos mecanismos relacionados com resistência a doenças. Esse processo pode restringir o desenvolvimento de patógenos, devido a um aumento na resistência da parede celular do hospedeiro.

deiro, à degradação por enzimas extracelulares, à restrição da difusão de patotoxinas e nutrientes, à inibição do crescimento de patógenos pela ação de precursores tóxicos, e também, devido a lignificação do próprio patógeno (KUČ, 1982). De acordo com HAMMERSCHMIDT & KUČ (1982), em plantas de pepino não protegidas mas geneticamente resistentes, a lignificação localizada ocorre rapidamente após a penetração por *C. cucumerinum*. A lignificação também ocorre em plantas de pepino suscetíveis infectadas com *C. cucumerinum* ou *C. lagenarium* mas a reação é retardada até que ocorra a ramificação do patógeno no interior do hospedeiro. Segundo os mesmos autores, a lignificação é mais rápida e intensa em plantas protegidas pelo tratamento indutor com *C. lagenarium*, *C. cucumerinum* e inoculadas posteriormente com *C. cucumerinum* ou *C. lagenarium*, respectivamente, do que em plantas não protegidas. Além disso, ambos os fungos geralmente apresentam um desenvolvimento restrito devido a lignificação. Por outro lado, de acordo com SIEGEL (1957), a quitina, um componente das paredes de muitos fungos, pode servir como matrix para a lignificação, enquanto trabalhos realizados por PEARCE & RICE (1980) demonstraram que ela pode servir como elicitor do processo de lignificação. Esta observação é consistente com o papel da lignificação na resistência à doença e proteção induzida.

2.5. VIABILIDADE DA PROTEÇÃO INDUZIDA NO CONTROLE DE DOENÇAS VEGETAIS

A literatura mostra vários trabalhos, onde a utilização da indução de proteção em plantas contra doenças, apresenta várias vantagens sobre os métodos de controle tradicionais. A indução de proteção é eficiente contra doenças fúngicas, bacterianas e viróticas (SEQUEIRA, 1983). Provavelmente a indução de proteção em plantas é dependente da ativação de vários mecanismos diferentes e, portanto, torna-se mais estável. Esses mecanismos ativados na indução de proteção e que estão presentes nas plantas, podem ser considerados seguros para o homem e o meio ambiente, assim como para as plantas (KUČ, 1987).

O fato da indução de proteção também apresentar-se sistêmica, demonstra uma outra vantagem da sua utilização no controle de doenças de plantas (DEAN & KUČ, 1986a; DEAN & KUČ, 1985 e HELLER & GESSLER, 1986). A transmissão da indução de proteção por enxertia, do porta-enxerto para enxerto, pode ser significativa, uma vez que muitas plantas são propagadas dessa forma.

O "sinal" químico natural para a proteção sistêmica embora ainda não tenha sido caracterizado é alvo de diversos experimentos que estão sendo desenvolvidos bem como os fatores que dão origem à produção do mesmo (KUČ, 1987).

2.6. INDUÇÃO DE PROTEÇÃO EM GRAMÍNEAS

Vários trabalhos mostram a possibilidade da indução de proteção em plantas pertencentes à família Gramineae. Híbridos de milho P.A.G. 15029, com citoplasma normal e Texas masculino estéril (Tms), previamente inoculados com a raça 0 de *Helminthosporium maydis* Nisikado & Miyake, apresentaram proteção cruzada contra a raça T do patógeno evidenciada pela redução do tamanho das lesões (NELSON & TUNG, 1973).

OUCHI et alii (1974) demonstraram que a suscetibilidade ou a resistência podiam ser induzidas em folhas de cevada (*Hordeum vulgare* L.) respectivamente pela inoculação com uma raça compatível ou incompatível de *Erysiphe graminis* DC. Estudando a localização da suscetibilidade e resistência induzidas em cultivares de cevada inoculados com raças de *E. graminis* f.sp. *hordei* Marchal e *E. graminis* f.sp. *tritici* Marchal, por um método de inoculação duplo, OUCHI et alii (1976) verificaram que a inibição do crescimento e a rejeição, provocadas por uma raça não patogênica de *E. graminis*, estavam restritas ao sítio inicial de interação incompatível propondo que o reconhecimento celular inicial e o subsequente condicionamento fisiológico da resistência eram estritamente localizados. Folhas de cevada expostas a uma raça compatível de *E. graminis* tornaram-se localmente suscetíveis ao não-patógeno *Sphaerotheca fuliginea* (Sch.) Pellaci.

Os resultados sugeriram que o reconhecimento primário seria irreversível, uma vez que as células estavam fisiologicamente condicionadas e que a informação requerida para esse estado não se deslocava a longa distância. Ainda em 1976, os mesmos autores demonstraram que o reconhecimento do patógeno pelas células de plântulas de cevada tornava-se de fato irreversível e que esse reconhecimento determinava a resposta de resistência, portanto, constituindo-se num evento de grande importância no parasitismo dos "oídios".

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido nos laboratórios e casa-de-vegetação da Seção de Bioquímica Fitopatológica do Instituto Biológico em São Paulo.

3.1. MATERIAIS

3.1.1. Planta

O híbrido de milho AG-352, obtido junto a Sementes Agrocere S/A, foi utilizado como a planta hospedeira nos diferentes experimentos de indução de proteção.

3.1.2. Fungos

Foram empregados no presente trabalho o fungo fitopatogênico *Colletotrichum graminicola*, obtido por repicagem da cultura BqF/12*, e a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, obtida a partir do

* BqF/12 - Micoteca da Seção de Bioquímica Fitopatológica - Instituto Biológico, S.P.

produto comercial "Fermento Biológico Fresco Fleischmann" (Fleischmann e Royal Produtos Alimentícios Ltda., Jundiaí, S.P.).

A levedura foi testada como o microorganismo indutor de proteção em plantas de milho contra *C. graminicola*.

O fermento biológico fresco é comercializado com teor de umidade ao redor de 65%, sendo composto de massa compacta de células leveduriformes de *S. cerevisiae* (tamanho de 3 a 12 μm) numa concentração aproximada de 10^9 - 10^{10} milhões de células/grama. As especificações do produto podem ser melhor visualizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Características do "Fermento Biológico Fresco Fleischmann"¹

Itens	Características
Cor	Creme claro
Odor	Característico
Sabor	Próprio
Aspecto	Massa prensada homogênea
Umidade	69 - 79%
Proteína DB	44,0 - 46,0%
Fosfato DB	2,0 - 2,2%
Células vivas	99 - 100%
Cinzas	8,5 - 9,0%

¹ OLIVEIRA, H.B. de (Gerente de Projetos - DPI - Produtos Alimentícios Fleischmann e Royal Ltda., Jundiaí, SP). Comunicação pessoal, 1988.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Cultivo do milho

As sementes do híbrido de milho foram colocadas para germinar em sacos plásticos (900 cm³) contendo uma mistura de terra e areia na proporção de 1:3, a razão de 10 sementes/saco. Dependendo dos requisitos experimentais, esse material foi mantido em condições de câmara de crescimento a 28°C e fotoperíodo de 14h sob luz fluorescente e 10h de escuro ou sob condições ambientais em casa-de-vegetação. As plantas foram utilizadas no estágio de 4 a 5 folhas.

3.2.2. Manutenção do fungo *C. graminicola* e obtenção de suspensões de conídios

O fungo *C. graminicola* foi mantido em placas de Petri (10 cm de diâmetro) contendo meio de batata-dextrose-água (BDA). Após um intervalo de 10-12 dias de incubação, sob luz fluorescente constante e temperatura ambiente, as suspensões de conídios foram obtidas acrescentando-se 10 ml de solução aquosa de Tween 20 0,05% (poli-oxietileno sorbitan monolaurato, Sigma Chemical Co.) às culturas esporulantes. Com uma alça de vidro a superfície das colônias foi raspada e os conídios liberados. Essa suspensão foi filtrada em gaze para a eliminação de restos do meio de cultura e pedaços de

micélio. Após a filtração, com o auxílio de um hematocitômetro (Improved Neubauer 1/400 SQ. MN.1/10 mm deep ultraplane) o número de conídios por ml foi calculado e ajustado para 5×10^5 .

3.2.3. Obtenção das preparações de *S. cerevisiae*

3.2.3.1. Produto comercial

As suspensões de células de *S. cerevisiae* foram obtidas pela diluição do produto comercial (Fermento Biológico Fleischmann) em água destilada estéril. A concentração das suspensões, variando de 0,005 a 25 mg produto/ml, foi ajustada pela adição de água destilada estéril. Tais suspensões foram mantidas sob agitação durante 5 min a temperatura ambiente e, então, utilizadas imediatamente nos experimentos.

3.2.3.2. Filtrado do produto comercial

Suspensões de células de *S. cerevisiae* na concentração de 15 mg produto comercial/ml, obtidas conforme descrito em 3.2.3.1., foram submetidas à filtração em membrana Millipore com poros de 0,8 e 0,45 μ m de diâmetro (Millipore Co., U.S.A.) a fim de remover as células. Os filtrados isentos de células, foram testados como indutores de proteção.

3.2.3.3. Células lavadas

Suspensões de células de *S. cerevisiae* na con

centração de 15 mg produto comercial/ml, preparadas como descrito em 3.2.3.1., foram centrifugadas a 2500 rpm em centrífuga de mesa marca Tomynga (modelo - Singlephase TD-65 AMP-S-4) por 10 min. Os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram retomados em igual volume de água destilada estéril. Essa operação foi repetida 3 vezes. As suspensões obtidas, a partir da última centrifugação, foram testadas como indutores de proteção.

3.2.3.4. Células isoladas

Uma suspensão de células de levedura na concentração de 15 mg produto comercial/ml, preparada como descrito em 3.2.3.1., foi aspergida sobre placas de Petri (10 cm de diâmetro) contendo meio de BDA, ao qual foram adicionados os antibióticos rifampicina e tetraciclina, numa concentração final de 20 µg/ml. Para o preparo do meio, 50 mg de cada antibiótico foram dissolvidos em 1 ml de ácido clorídrico 0,2N. As soluções, assim obtidas, foram diluídas em água destilada estéril para um volume final de 10 ml. Uma alíquota de 4 ml da solução de cada antibiótico foi adicionada a 1 litro de meio de BDA, a temperatura aproximada de 40°C.

Após um período de incubação de 2 dias sob luz fluorescente constante e temperatura ambiente, foi observado o crescimento das colônias de *S. cerevisiae* nas placas. Com o auxílio de uma alça, algumas colônias foram transferidas para placas de Petri contendo meio de BDA sem antibióti

co. Após 5 dias de incubação nas condições acima, as suspensões de células foram obtidas acrescentando-se 10 ml de água destilada estéril às colônias. Com uma alça de vidro a superfície das colônias foi raspada. As suspensões de células assim obtidas foram ajustadas para aproximadamente $8,9 \times 10^7$ células /ml, com o auxílio de um hematocitômetro, o equivalente ao número aproximado de células presentes em 15 mg produto comercial/ml. Tais suspensões foram testadas como indutores de proteção.

3.2.3.5. Filtrado de células isoladas

As suspensões de células isoladas (aproximadamente $8,9 \times 10^7$ células/ml), obtidas como descrito em 3.2.3.4., foram submetidas a filtração através de membranas Millipore com poros de 0,8 e 0,45 μ m de diâmetro, a fim de remover as células de levedura. Os filtrados obtidos a partir de células isoladas foram, então, testados como indutores de proteção.

3.2.3.6. Tratamento térmico das preparações de *S. cerevisiae*

Dependendo dos experimentos, as suspensões e/ou filtrados testados como indutores, foram previamente submetidos a autoclavagem a 120°C durante 20 min a 1 atmosfera.

3.2.4. Tratamento das plantas com as preparações e inoculação com *C. graminicola*

3.2.4.1. *C. graminicola* inoculado no mesmo local de aplicação das preparações de *S. cerevisiae*

Inicialmente, as suspensões derivadas da diluição do produto comercial, preparadas em concentrações variando de 0,005 a 25 mg produto/ml, como descrito em 3.2.3.1., foram aspergidas sobre a 5ª folha a partir da base de plantas de milho. Para cada tratamento foram utilizadas 18 plantas. Nas plantas controle, as suspensões foram substituídas por água destilada estéril. A aspersão foi feita com o auxílio de um aspersor de vidro, tendo como agente propulsor o gás nitrogênio, numa pressão aproximada de 0,25 bars.

Após 24 h, sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 14 h (luz fluorescente), as mesmas folhas foram inoculadas, por aspersão, com suspensão de conídios de *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). Durante as primeiras 24 h após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% U.R.) a temperatura ambiente e fotoperíodo de 14h (luz fluorescente). Em seguida o material foi transferido para casa-de-vegetação e mantido sob condições de temperatura e luminosidade ambiente. A proteção das plantas foi avaliada 5 dias após a inoculação do fitopatógeno, com base na área lesionada das folhas, número de lesões/cm² e capacidade de esporulação do fungo no tecido foliar, como des-

crito em 3.2.5. O desenvolvimento do patógeno no tecido foi avaliado com base na germinação e na formação de apressórios pelos conídios, conforme descrito em 3.2.6.1, 15 h após a inoculação.

O processo descrito acima visando o tratamento indutor e a inoculação das folhas com o patógeno, foi o mesmo utilizado para se testar os diferentes preparados de *S. cerevisiae* constantes do item 3.2.3.

3.2.4.2. *C. graminicola* inoculado a distância
do local de aplicação das
preparações de *S. cerevisiae*

As diferentes preparações de *S. cerevisiae*, obtidas como descrito em 3.2.3., foram aspergidas sobre a 4ª folha a partir da base das plantas de milho. Para cada tratamento foram utilizadas 18 plantas. Nas plantas controle, as suspensões foram substituídas por água destilada estéril. A aspersão foi feita com o auxílio de um aspersor de vidro, como descrito em 3.2.4.1.

Após 24h, sob condições de temperatura ambiente e fotoperíodo de 14h (luz fluorescente), a 5ª folha a partir da base das plantas tratadas foi inoculada com suspensão de conídios de *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). Durante as primeiras 24h após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida (100% U.R.) a temperatura ambiente e fotoperíodo de 14h (luz fluorescente). Em seguida, o material

foi transferido para casa-de-vegetação e mantido sob condições de temperatura e luminosidade ambiente. As porcentagens de germinação e formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* na 5ª folha das plantas de milho, foram avaliadas 15h após a inoculação, conforme descrito em 3.2.6.1. A proteção das plantas foi avaliada 5 dias após a inoculação com o fitopatógeno, com base na área lesionada das folhas, número de lesões/cm² e capacidade de esporulação do fungo nos tecidos, como descrito em 3.2.5.

Por outro lado, as diferentes preparações de *S. cerevisiae* também foram aspergidas sobre a 5ª folha de plantas de milho e, 24h depois, a 4ª folha foi inoculada com suspensão de conídios de *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). Os parâmetros avaliados foram os mesmos citados acima.

3.2.5. Avaliação da proteção

A resposta protetora foi expressa em termos de porcentagem de proteção (%P), com base na área foliar lesionada, número de lesões/cm² e esporulação do *C. graminicola* nas folhas, a qual foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\%P = \frac{(A - B) \times 100}{A}$$

A = % infecção no tratamento controle

B = % infecção no tratamento com indução.

3.2.5.1. Determinação do número de lesões nas folhas de milho

A determinação do número de lesões nas folhas de plantas de milho foi efetuada 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Foi utilizada uma folha por planta, num total de 18 plantas por tratamento.

As folhas foram retiradas das plantas seccionando-se as mesmas junto ao colmo. Cada folha destacada foi dividida no sentido transversal, em três segmentos de comprimentos iguais, como mostrado na Figura 1, onde (A) correspondia ao segmento foliar próximo ao colmo, (B) ao segmento foliar central e (C) ao segmento foliar da extremidade.

Figura 1. Diagrama de uma folha de milho ilustrando os segmentos foliares. (A) segmento foliar próximo ao colmo; (B) segmento foliar central; (C) segmento foliar da extremidade. As avaliações constantes do presente trabalho foram efetuadas no segmento foliar central (B).

Em função dos experimentos preliminares conduzidos, o número de lesões foi determinado somente no segmento central (B). Para isto, esse segmento foi seccionado e sua área foliar total (cm²) calculada com o auxílio de um planímetro polar (OTT - Compensations - Planimeter Nr. 19 für 4 qmm MeBeinheit - Bender & Hobein - München). Assim, esse valor foi calculado através da fórmula:

$$\text{Nº de lesões/cm}^2 = \frac{\text{Nº de lesões no segmento foliar central}}{\text{Área do segmento foliar central (cm}^2\text{)}}$$

Os resultados em cada tratamento foram expressos como número médio de lesões/cm².

3.2.5.2. Determinação da área foliar lesionada

A avaliação da área lesionada nas folhas de plantas de milho foi efetuada 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*, utilizando-se o segmento foliar central, obtido conforme descrito em 3.2.5.1. O contorno das lesões nas folhas de cada um dos tratamentos foi traçado através do processo de transparência para placas de vidro e posteriormente, para folhas de papel de seda.

A área foliar total e lesionada foram calculadas com o auxílio de um planímetro polar e a porcentagem da área lesionada foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ Área foliar lesionada} = \frac{\text{Área lesionada do segmento foliar (cm}^2\text{)}}{\text{Área total do segmento foliar (cm}^2\text{)}} \times 100$$

Os resultados em cada tratamento foram expressos como área lesionada.

3.2.5.3. Capacidade de esporulação do *C. graminicola* nas folhas de milho

A produção de conídios por *C. graminicola* foi estimada na 5ª folha de plantas de milho, 5 dias após a inoculação com o fungo. Amostras de tecido foliar, obtidas a partir do segmento foliar central (Figura 1), medindo aproximadamente 3 x 3cm, perfazendo um total de 18 amostras por tratamento, foram coletadas e mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio 1% durante 15 s para desinfecção superficial. A seguir, as amostras de folha foram lavadas em água destilada estéril e dispostas sobre papel toalha umidecido no interior de placas de Petri. As placas assim preparadas, foram incubadas sob luz fluorescente constante a temperatura de 24-28°C durante 48 h. Após esse período, as amostras de folhas foram retiradas e colocadas individualmente no interior de frascos de vidro transparente contendo 3 ml de solução aquosa de lactofenol (2 ml de lactofenol (fenol - ácido láctico-glicerina; v/v/v) em 100 ml de água destilada). Os frascos foram submetidos a agitação manual durante 10 s. A seguir, o número de conídios presentes na suspensão foi avaliado com o auxílio de um hematocitômetro e a concentração final expressa como n° conídios/ml.

3.2.6. Influência das preparações de *S. cerevisiae*
no desenvolvimento de *C. graminicola*
"in vivo" e "in vitro"

3.2.6.1. Efeito das preparações de
S. cerevisiae na germinação e
formação de apressórios por conídios
de *C. graminicola* em folhas de milho

Folhas de milho (5ª folha) foram aspergidas com as preparações provenientes de *S. cerevisiae*, descritas em 3.2.3. Simultaneamente ou após um período de 24 h, as mesmas folhas foram inoculadas com suspensões de conídios de *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml), como descrito em 3.2.4. Nas plantas controle, as preparações foram substituídas por água destilada estéril. Seguindo a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara-úmida (100% U.R.), a temperatura ambiente e fotoperíodo de 14h (luz fluorescente). A porcentagem de germinação e formação de apressórios pelos conídios nas folhas foi avaliada 15h após a inoculação, através do uso de microscopia de fluorescência. Para tal, foram retirados, com o auxílio de um furador de papel, 50 discos foliares de aproximadamente 0,5 cm de diâmetro para cada um dos tratamentos. Os discos foram dispostos em lâmina de vidro para microscopia com a superfície adaxial das folhas voltada para cima (10 discos por lâmina). A superfície exposta dos discos, foi primeiramente embebida em lactofenol, o qual agiu como fixador e ao mesmo tempo como bloqueador do

desenvolvimento do fungo. Após 10 min, o lactofenol foi removido com o auxílio de um papel de filtro e, em seguida, as amostras foram lavadas com solução tampão TRIS-HCl 0,1M (pH 8,5). A solução tampão foi, então, removida, e os discos de folhas foram tratados durante 2 min com fluorocromo Tinopal BOP 0,25% (Ciba-Geigy Química S.A., São Paulo) na mesma solução tampão. A seguir, a solução de fluorocromo foi removida e as amostras foram tratadas e montadas em glicerina 100% para observação em microscópio Leitz-Orthoplan equipado para epifluorescência (MARTINS et alii, 1988). Sob aumento de 400X, um mínimo de 100 conídios foi avaliado em cada lote de 5 discos e finalmente calculada a porcentagem média de germinação com base em 10 lotes de discos por tratamento. Por sua vez, a porcentagem de formação de apressórios por *C. graminicola* foi avaliada com base nos conídios germinados.

3.2.6.2. Efeito das preparações de *S. cerevisiae* na germinação de *C. graminicola* "in vitro"

Suspensões e/ou filtrados, autoclavados ou não, preparados como descrito em 3.2.3. e suspensões de conídios de *C. graminicola*, preparadas como descrito em 3.2.2., foram utilizadas neste experimento. As diferentes preparações foram combinadas com suspensões de conídios, de maneira que a mistura final apresentasse as concentrações previamente utilizadas nos experimentos constantes dos itens 3.2.3. e

3.2.4. Gotas de 20 μ l das misturas acima foram colocadas sobre lâminas de microscopia, em um total de 10 lâminas para cada tratamento. As lâminas assim preparadas foram, então, colocadas no interior de placas de Petri e mantidas em câmara escura a temperatura ambiente. Após 15 h de incubação, a germinação dos conídios foi bloqueada pela adição do azul-algodão de lactofenol (TUIITE, 1969) e a porcentagem de germinação determinada. Um mínimo de 100 conídios foram contados por lâmina.

3.2.6.3. Efeito de células de *S. cerevisiae*
no crescimento micelial de
C. graminicola em meio de
batata-dextrose-ágar

Suspensões de células de *S. cerevisiae* isoladas e mantidas como descrito em 3.2.3.4., foram repicadas em risca sobre meio de BDA vertido no interior de placas de Petri (10 cm de diâmetro). Após 72h sob luz fluorescente constante ou condições de escuro, um disco de meio de BDA (0,5cm de diâmetro) contendo micélio de *C. graminicola* foi colocado em uma das extremidades de cada placa, isto é, do lado oposto as colônias de *S. cerevisiae* repicadas em forma de risca. Nas placas controle as colônias de *S. cerevisiae* foram substituídas por água destilada estéril. A inibição do crescimento micelial de *C. graminicola* foi observado após 5 dias de incubação das culturas a temperatura ambiente e sob luz fluorescente constante ou condições de escuro.

4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUSPENSÕES DE *S. cerevisiae*, PREPARADAS A PARTIR DO PRODUTO COMERCIAL E SUBMETIDAS OU NÃO A TRATAMENTO TÉRMICO, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

4.1.1. Suspensões não submetidas a tratamento térmico

Suspensões de células de *S. cerevisiae*, quando aspergidas sobre a 5ª folha de plantas de milho, a partir da base, dependendo da concentração, alteraram a porcentagem de germinação e formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* (Tabela 2). Da mesma forma, dependendo da concentração, as suspensões mostraram-se efetivas na redução da doença, com base na área foliar lesionada, número de lesões nas folhas e esporulação do fungo nos tecidos (Tabela 3).

Tabela 2. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial, na germinação e formação de apressórios por conídios de *Colletotrichum graminicola* inoculados em folhas de milho.

Concentração (mg/ml) ¹	Germinação (%)	Formação de apressórios (%)
Controle	72,3 ± 2,6 a ²	67,0 ± 4,6 a
0,005	68,6 ± 3,4 a	67,9 ± 2,3 a
0,05	64,6 ± 3,6 a	64,8 ± 2,1 a
0,5	11,5 ± 0,9 b	11,8 ± 0,9 b
5	14,4 ± 1,7 b	11,5 ± 0,9 b
15	13,5 ± 1,6 b	13,9 ± 1,0 b
25	12,4 ± 0,9 b	13,5 ± 1,5 b

¹ Suspensões de células de *S. cerevisiae*, preparadas a partir do "Fermento Biológico Fleischmann", aspergidas 24 h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril.

² Avaliações efetuadas 15h após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média ± 2x erro padrão. Médias seguidas da mesma letra, em fileiras verticais, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Teste de Newman Keuls).

Tabela 3. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial, na manifestação da antracnose em folhas de milho.

Concentração (mg/ml) ¹	Área lesionada (%)	Nº médio de lesões/cm ²	Nº médio de conídios/cm ²
Controle	6,8 ± 0,2 a ²	9,0 ± 0,4 a	195,3 ± 4,0 a
0,005	6,4 ± 0,1 a	9,1 ± 0,4 a	192,9 ± 5,9 a
0,05	6,3 ± 0,1 a	9,3 ± 0,4 a	195,8 ± 5,2 a
0,5	0,9 ± 0,1 b	1,1 ± 0,5 b	184,5 ± 11,0 a
5	0,9 ± 0,1 b	0,9 ± 0,4 b	46,2 ± 4,2 b
15	0,9 ± 0,1 b	0,9 ± 0,4 b	50,3 ± 5,1 b
25	0,7 ± 0,1 b	0,8 ± 0,4 b	53,2 ± 3,7 b

¹ Suspensões de células de *S. cerevisiae*, preparadas a partir do "Fermento Biológico Fleischmann", aspergidas 24 h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril.

² Avaliações efetuadas 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média ± 2x erro padrão. Médias seguidas da mesma letra, em fileiras verticais, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Teste de Newman Keuls).

Com relação aos sintomas da doença nas folhas de milho, como é ilustrado na Figura 2 (tratamento H₂O - *C. gramínicola*), 5 dias após a inoculação do patógeno o tecido foliar apresentava lesões necróticas em sentido longitudinal ($28 \pm 0,4$ mm em comprimento), coalescidas ou não, de coloração marrom escuro nas bordas e palha no centro. Essas lesões puderam ser visualizadas tanto no limbo foliar como na nervura central e mostraram-se circundadas ou não por tecido descolorido. A descoloração dos tecidos também estendeu-se para regiões do limbo foliar onde as lesões não ocorreram. Porém, quando as folhas foram submetidas ao tratamento com suspensões de células de *S. cerevisiae* antes da inoculação com *C. gramínicola*, nos tratamentos com concentrações do produto comercial iguais ou superiores a 0,5 mg/ml, como evidenciado na Figura 2 (Tratamento *S. cerevisiae* 15 mg/ml - *C. gramínicola*) as folhas apresentaram lesões necróticas em menor número, menor tamanho ($2 \pm 0,6$ mm em comprimento), não coalescidas e de coloração palha no centro e marrom claro nas bordas. A descoloração dos tecidos em torno das lesões e no limbo foliar praticamente não ocorreu.

Os mesmos resultados, apresentados graficamente na Figura 3A demonstram a capacidade das suspensões de células de *S. cerevisiae*, em concentrações iguais ou superiores a 0,5 mg/ml, em inibir a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. gramínicola* em torno de 80%. Também é demonstrada a capacidade dessas suspensões, em concentrações iguais

Figura 2. Influência de diferentes concentrações de suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae* ("Fermento Biológico Fresco") na manifestação dos sintomas induzidos por *Colletotrichum graminicola* em folhas de milho.

Figura 3. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial, na germinação e formação de apressórios por conídios de *Colletotrichum graminicola* (A) e na redução da antracnose em folhas de plantas de milho (B). Valores da porcentagem de inibição e proteção calculados em relação aos valores dos tratamentos controle (vide Tabelas 2 e 3).

ou superiores a 0,5 mg/ml, em reduzir a área foliar lesionada e o número médio de lesões/cm² por volta de 87% (Figura 3B). Por outro lado, o número médio de conídios/cm² decresceu em cerca de 75% em resposta ao tratamento prévio das folhas somente com suspensões do produto comercial em concentrações iguais ou superiores a 5 mg/ml (Figura 3B).

4.1.2. Suspensões submetidas a tratamento térmico

Pela observação dos resultados constantes das Tabelas 4 e 5, verifica-se que as suspensões de células, quando submetidas ao tratamento térmico, perdem a capacidade de alterar a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* nas folhas bem como a capacidade de inibir a manifestação da doença.

4.2. INFLUÊNCIA DO INTERVALO DE TEMPO ENTRE O TRATAMENTO DAS FOLHAS COM SUSPENSÕES DE *S. cerevisiae*, OBTIDAS A PARTIR DO PRODUTO COMERCIAL, E A INOCULAÇÃO COM *C. graminicola* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO PATÓGENO E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

Com relação aos intervalos de tempo entre a aplicação das suspensões de *S. cerevisiae* e a inoculação de *C. graminicola* em folhas de plantas de milho, os resultados

Tabela 4. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células autoclavadas de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial, na germinação e formação de apressórios por conídios de *Colletotrichum graminicola* inoculados em folhas de milho.

Concentração (mg/ml) ¹	Germinação (%)	Formação de apressórios (%)
Controle	73,7 ± 2,1 ²	72,8 ± 1,9
0,005	73,9 ± 1,9	71,7 ± 1,4
0,05	72,9 ± 2,1	70,8 ± 1,3
0,5	72,6 ± 1,8	70,9 ± 1,4
5	72,7 ± 1,7	72,0 ± 1,5
15	76,2 ± 1,8	70,9 ± 1,7
25	75,5 ± 2,2	70,3 ± 1,1

¹ Suspensões de células autoclavadas de *S. cerevisiae*, preparadas a partir do "Fermento Biológico Fleischmann", aspergidas 24 h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril.

² Avaliações efetuadas 15h após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média ± 2x erro padrão. Médias, em fileiras verticais, não diferem significativamente ao nível de 5% (Análise de Variância).

Tabela 5. Efeito de diferentes concentrações de suspensões de células autoclavadas de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial, na manifestação da antracnose em folhas de milho.

Concentração (mg/ml) ¹	Área lesionada (%)	Nº médio de lesões/cm ²	Nº médio de conídios/cm ²
Controle	6,7 ± 0,3 ²	9,3 ± 0,5	179,7 ± 0,8
0,005	6,8 ± 0,3	9,1 ± 0,5	178,2 ± 1,7
0,05	6,7 ± 0,3	9,1 ± 0,5	179,0 ± 1,5
0,5	6,8 ± 0,3	8,9 ± 0,4	178,0 ± 1,4
5	6,8 ± 0,3	8,8 ± 0,4	178,8 ± 1,0
15	6,6 ± 0,3	8,8 ± 0,5	179,5 ± 0,8
25	6,8 ± 0,3	9,2 ± 0,5	179,5 ± 0,8

¹ Suspensões de células autoclavadas de *S. cerevisiae*, preparadas a partir do "Fermento Biológico Fleischmann", aspergidas 24 h antes da inoculação com *C. graminicola* (5 x 10⁵ conídios/ml). Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril.

² Avaliações efetuadas 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam média ± 2x erro padrão. Médias em fileiras verticais, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Análise de Variância).

mostrados na Tabela 6 evidenciam que em intervalos superiores a 24h, as suspensões de células perdem a capacidade de alterar a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. graminícola*.

No tocante a manifestação da doença, os resultados mostrados na Tabela 7 também evidenciam que em intervalos superiores a 24h, as suspensões perdem a capacidade de reduzir a área foliar lesionada, o número de lesões/cm² e a esporulação de *C. graminícola* nos tecidos. Em intervalos iguais ou inferiores a 24h, entretanto, a área foliar lesionada, o número médio de lesões/cm² e a esporulação do fungo, foram reduzidos em torno de 87%, 83% e 75%, respectivamente.

4.3. EFEITO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE *S. cerevisiae*, SUBMETIDAS OU NÃO AO TRATAMENTO TÉRMICO, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminícola* E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

Com base nos resultados mostrados nas Tabelas 2 e 3 e na Figura 3 a concentração de 15 mg/ml do produto comercial de *S. cerevisiae* mostrou-se adequada para uso nos experimentos subsequentes envolvendo a proteção de plantas de milho contra *C. graminícola*.

Tabela 6. Influência do intervalo de tempo entre o tratamento das folhas de milho com suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* e a inoculação com *Colletotrichum graminicola* na germinação e formação de apressórios por conídios de *C. graminicola*.

Intervalo (horas) ¹	Germinação (%)	Formação de apressórios (%)
0	11,7 ± 1,7 a ²	11,7 ± 0,9 a
6	11,5 ± 1,2 a	12,1 ± 1,0 a
12	11,3 ± 1,3 a	12,9 ± 1,1 a
24	12,0 ± 1,1 a	12,6 ± 0,8 a
48	62,5 ± 4,1 b	59,6 ± 4,7 b
96	59,5 ± 4,2 b	59,3 ± 4,5 b
168	60,7 ± 3,4 b	60,0 ± 4,0 b
240	57,4 ± 3,0 b	57,8 ± 3,8 b
Controle	62,5 ± 3,4 b	58,3 ± 3,7 b

¹ Intervalo em horas entre a aspersão das suspensões e a inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml) nas folhas. Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril no tempo zero.

² Avaliações efetuadas 15h após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média ± 2x erro padrão, considerando-se 10 réplicas por tratamento. Médias seguidas da mesma letra, em fileiras verticais, não diferem entre si ao nível de 5% (Teste de Newman Keuls).

Tabela 7. Influência do intervalo de tempo entre o tratamento das folhas de milho com suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* e a inoculação com *Colletotrichum graminicola* na manifestação da antracnose em milho.

Intervalo (horas) ¹	Área lesionada (%)	Nº médio de lesões/cm ²	Nº médio de conídios/cm ²
0	0,9 ± 0,1 a ²	1,6 ± 0,6 a	49,5 ± 1,0 a
6	0,8 ± 0,1 a	1,9 ± 0,7 a	49,8 ± 1,6 a
12	0,9 ± 0,1 a	1,5 ± 0,6 a	47,2 ± 3,1 a
24	1,0 ± 0,1 a	1,9 ± 0,8 a	47,8 ± 5,4 a
48	7,1 ± 0,1 b	9,8 ± 0,8 b	202,6 ± 3,7 b
96	7,1 ± 0,1 b	10,0 ± 0,7 b	197,6 ± 6,7 b
168	7,1 ± 0,1 b	10,0 ± 0,9 b	200,1 ± 3,9 b
240	7,2 ± 0,1 b	10,1 ± 0,8 b	195,4 ± 6,9 b
Controle	7,3 ± 0,1 b	10,1 ± 0,8 b	195,7 ± 5,2 b

¹ Intervalo em horas entre a aspersão das suspensões e a inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml) nas folhas. Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril no tempo zero.

² Avaliações efetuadas 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam média ± 2x erro padrão. Médias seguidas da mesma letra, em fileiras verticais, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Teste de Newman Keuls).

4.3.1. Preparações não submetidas a tratamento térmico

Como pode ser observado na Figura 4, as diferentes preparações, obtidas diretamente do produto comercial ou a partir de células de *S. cerevisiae* cultivadas em meio de BDA, reduziram em torno de 75-90% a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* inoculados nas folhas de milho. Da mesma forma, os resultados constantes da Figura 5 demonstram a capacidade das mesmas preparações em reduzir em torno de 80-93% a área foliar lesionada e em torno de 60-90% o número médio de lesões nas folhas.

4.3.2. Preparações submetidas a tratamento térmico

Pela observação dos resultados nas Figuras 4 e 5, verifica-se que as preparações, quando submetidas ao tratamento térmico, perdem a capacidade de alterar a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* nas folhas e de inibir a manifestação da doença.

Figura 4. Efeito de diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ou não a tratamento térmico, sobre a germinação (A) e a formação de apressórios (B) por conídios de *Colletotrichum graminicola* inoculados em folhas de plantas de milho. Tratamentos efetuados 24h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml). FER = fermento biológico (15 mg/ml); FIL = filtrado do fermento; CLA = células do fermento lavadas; CIS = células isoladas a partir do fermento e mantidas em meio BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: preparações substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 15h após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média $\pm 2x$ erro padrão, considerando-se 10 réplicas por tratamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% (Teste de Newman Keuls).

Figura 5. Efeito de diferentes preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ou não a tratamento térmico, sobre a manifestação da antracnose em folhas de milho. (A) área lesionada; (B) número médio de lesões/cm². Tratamentos efetuados 24h antes da inoculação com *Colletotrichum graminicola*. FER = fermento biológico 15 mf/ml; FIL = filtrado do fermento; CLA = células do fermento lavadas; CIS = células isoladas do fermento e mantidas em meio de BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: suspensões substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média $\pm$ 2x erro padrão, considerando-se 10 réplicas por tratamento. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Teste de Newman-Keuls).

4.4. INFLUÊNCIA DAS PREPARAÇÕES DE *S. cerevisiae*, QUANDO APLICADAS A DISTÂNCIA DO SÍTIO DE INOCULAÇÃO DO PATÓGENO, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* E DA MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

4.4.1. Preparações aplicadas na 4ª folha e conídios de *C. graminicola* inoculados na 5ª folha

Os resultados constantes das Figuras 6 e 7 mostram que as preparações de *S. cerevisiae*, submetidas ou não ao tratamento térmico, quando aplicadas na 4ª folha não alteram o desenvolvimento de *C. graminicola* assim como a expressão da doença na 5ª folha.

4.4.2. Preparações aplicadas na 5ª folha e conídios de *C. graminicola* inoculados na 4ª folha

Os resultados constantes das Figuras 8 e 9 evidenciam que as preparações de *S. cerevisiae*, submetidas ou não ao tratamento térmico, quando aplicadas na 5ª folha não alteram o desenvolvimento de *C. graminicola* e a manifestação da doença na 4ª folha.

Figura 6. Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância do sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola* na germinação (A) e na formação de apressórios (B) por conídios de *C. graminicola*, em folhas de milho. Preparações aspergidas sobre a 4ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* na 5ª folha. FER = fermento biológico 15 mg/ml; FIL = filtrado do fermento; CLA = células do fermento lavadas; CIS = células isoladas do fermento e mantidas em meio de BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: preparações substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 15h após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média $\pm 2x$ erro padrão, considerando-se 10 réplicas por tratamento. Médias não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Análise de Variância).

Figura 7. Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância do sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola*, na manifestação da antracnose em folhas de milho. (A) área lesionada; (B) número médio de lesões/cm²; (C) número médio de conídios/cm². Preparações aspergidas sobre a 4ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml) na 5ª folha. FER = fermento biológico (15 mg/ml); FIL = filtrado do fermento; CLA = células do fermento lavadas; CIS = células isoladas do fermento e mantidas em meio de BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: preparações substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média $\pm 2x$ erro padrão. Médias não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Análise de Variância).

Figura 8. Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância do sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola*, na germinação (A) e na formação de apressórios (B) por conídios de *C. graminicola* em folhas de milho. Preparações aspergidas sobre a 5ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* na 4ª folha. FER = fermento biológico (15mg/ml); FIL = filtrado do fermento; CLA = células lavadas; CIS = células isoladas do fermento e mantidas em meio de BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: Preparações substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 15h após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média $\pm 2x$ erro padrão, considerando-se 10 réplicas por tratamento. Médias não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Análise de Variância).

Figura 9. Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, quando aplicadas a distância do sítio de inoculação com *Colletotrichum graminicola*, na manifestação da antracnose em folhas de milho. (A) área lesionada; (B) número de lesões/cm²; (C) número médio de conídios/cm². Preparações aspergidas sobre a 5ª folha 24h antes da inoculação com *C. graminicola* (5×10^5 conídios/ml) na 4ª folha; FER=fermento biológico (15mg/ml); FIL = filtrado do fermento; CLA = células do fermento lavadas; CIS = células isoladas do fermento e mantidas em meio de BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: preparações substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 5 dias após a inoculação com *C. graminicola*. Valores representam a média $\pm 2x$ erro padrão. Médias não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Análise de Variância).

4.5. EFEITO DAS PREPARAÇÕES DE *S. cerevisiae* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* "IN VITRO"

4.5.1. Efeito na germinação de *C. graminicola* "in vitro"

Os resultados apresentados na Figura 10 evidenciam a capacidade das preparações, não submetidas ao tratamento térmico, em reduzir a germinação de *C. graminicola* "in vitro" por volta de 57 a 85%. Contudo, as preparações perdem por completo essa habilidade quando autoclavadas a 120°C.

4.5.2. Efeito de células de *S. cerevisiae* isoladas a partir do "Fermento Biológico Fresco" sobre o crescimento micelial de *C. graminicola* em meio de batata-dextrose-água

Os resultados ilustrados na Figura 11 demonstram que quando células de *S. cerevisiae* foram aplicadas em risca sobre o meio de BDA, 3 dias antes da colocação do disco contendo o inóculo de *C. graminicola* a distância da levedura, o crescimento radial do fungo diminuiu comparativamente ao tratamento controle.

Figura 10. Efeito das preparações de *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas ou não a tratamento térmico, na germinação dos conídios de *Colletotrichum graminicola* "in vitro". Gotículas (20 µl) contendo as preparações e conídios dispostas sobre lâminas de microscopia. FER = fermento biológico (15 mg/ml); FIL = filtrado do fermento; CLA = células lavadas do fermento; CIS = células isoladas do fermento e mantidas em meio de BDA; FCI = filtrado de células isoladas. Controle: preparações substituídas por água destilada estéril. Avaliações efetuadas 15h após o início do experimento. Valores representam a média $\pm$ 2x erro padrão. Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si ao nível de 5% (Teste de Newman-Keuls).

Figura 11. Influência de células de *Saccharomyces cerevisiae*, isoladas a partir do "Fermento Biológico Fresco", sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum graminicola* em meio de batata-dextrose-água. *S. cerevisiae* repicada em risca no meio de batata-dextrose-água 3 dias antes da colocação do disco contendo micélio de *C. graminicola*. Placas mantidas sob condições de luz ou escuro.

5. DISCUSSÃO

5.1. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE SUSPENSÕES DE *S. cerevisiae*, PREPARADAS A PARTIR DO PRODUTO COMERCIAL E SUBMETIDAS OU NÃO A TRATAMENTO TÉRMICO, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

Diversos autores, trabalhando com diferentes sistemas hospedeiro-patógeno, tem demonstrado que plantas previamente tratadas com o mesmo patógeno usado na inoculação posterior (CARUSO & KUČ, 1977; HELLER & GESSLER, 1986; METRAUX, 1986), raças avirulentas do patógeno (ELLISTON et alii, 1976), formas inativadas do patógeno (LOVREKOVICH & FARKAS, 1965; MARTINS et alii, 1985), constituintes celulares do mesmo ou de patógenos diferentes (GRAHAM et alii, 1977; McINTYRE et alii, 1975) e outros patógenos (JENNS & KUČ, 1980), podem desenvolver uma resposta protetora contra uma subsequente inoculação com um patógeno. Por outro lado, diversos trabalhos também evidenciam a possibilidade da proteção de plantas contra fitopatógenos, pela aplicação de mi-

croorganismos, os quais atuam diretamente sobre esses fitopatógenos através da competição por nutrientes e/ou pela produção de metabólitos tóxicos (COOK & BAKER, 1983). Como exemplo, pode-se citar a ação de leveduras e bactérias saprofíticas, isoladas da filosfera (LEBEN, 1964; WILLIAMSON & FOKKEMA, 1985) ou fungos e bactérias fitopatogênicas (BALASS & LEVY, 1984; DAVIS et alii, 1984; LUZ & BERGSTROM, 1986 e SULE, 1988) na redução do desenvolvimento de patógenos em geral.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram a capacidade de suspensões de células de *S. cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial "Fermento Biológico Fresco", em reduzir a germinação e a formação de apressórios por conídios de *C. graminicola* bem como a infecção em folhas de plantas de milho pelo patógeno. Essa redução no desenvolvimento de *C. graminicola* e na manifestação da doença ocorreu quando as folhas foram tratadas com suspensões de células em concentrações acima de 0,5 mg/ml (Tabelas 2 e 3). Porém, essa redução não ocorreu quando as folhas foram tratadas com suspensões termicamente inativadas.

Com base no exposto, pode-se supor que as células de *S. cerevisiae* interferem com o desenvolvimento de *C. graminicola* e da doença, por meio de dois mecanismos distintos: o primeiro poderia envolver a ação direta da levedura sobre o fungo através de uma competição por nutrientes e/ou a produção de algum(ns) metabólito(s) tóxico(s) e o segundo, poderia envolver a indução de proteção nas folhas. A

competição por nutrientes pode ser suportada pelo trabalho de WILLIAMSON & FOKKEMA (1985), que trabalhando com as leveduras *Sporobolomyces roseus* Kluyver & Van Niel, e *Cryptococcus laurentii* var. *flavescens* Loder & Van Rij, as quais foram aspergidas sobre a 4ª folha de plantas de milho 3 dias antes da inoculação com *C. graminicola*, observaram a redução da infecção foliar devido ao baixo índice de penetração do patógeno. Em vista do possível envolvimento de determinadas enzimas, como celulase e quitinase, no processo de penetração do tecido hospedeiro, os autores sugeriram que o decréscimo na disponibilidade de alguns nutrientes, em função da presença das células de levedura, poderia afetar algum (ns) mecanismo(s) envolvido(s) na síntese dessas enzimas.

No tocante a indução de proteção, HAHN & ALBERSHEIM (1978) verificaram que extratos de autolisados de *S. cerevisiae* possuem a capacidade de estimular o(s) mecanismo(s) de defesa de plantas de soja (*Glycine max* L.) contra *Phytophthora megasperma* Drechsler.

Por sua vez, a inativação térmica das células de levedura, a qual anula a capacidade dessas células em interferir com o desenvolvimento de *C. graminicola* e a manifestação da doença pode indicar a necessidade da presença de células vivas bem como a possibilidade da existência de metabólitos termolábeis. Porém, a necessidade da presença de células vivas precisaria ter sido comprovada experimentalmente através da utilização de extratos livres de células.

5.2. INFLUÊNCIA DO INTERVALO DE TEMPO ENTRE O TRATAMENTO DAS FOLHAS COM SUSPENSÕES DE *S. cerevisiae* E A INOCULAÇÃO COM *C. graminicola* SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO PATÓGENO E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

Os resultados evidenciam, que a capacidade protetora das suspensões de células é perdida 24h após a aspersão das mesmas sobre as folhas (Tabelas 6 e 7). Essa observação pode ser suportada pelo fato de que para a manutenção da viabilidade das células, o produto comercial "Fermento Biológico Fresco" necessita ser conservado a temperaturas abaixo de 10°C e ser utilizado em períodos menores do que 15 dias (Oliveira¹). Por outro lado, a perda de viabilidade após 24h mostra-se inesperada, visto as leveduras exibirem uma certa tolerância a condições adversas do meio ambiente (BASHI & FOKKEMA, 1977).

5.3. EFEITO DE DIFERENTES PREPARAÇÕES DE CÉLULAS DE *S. cerevisiae* SUBMETIDAS OU NÃO A TRATAMENTO TÉRMICO, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

Visando esclarecer o mecanismo de ação das células de *S. cerevisiae* sobre o desenvolvimento de *C. graminicola*

¹ OLIVEIRA, H.B. de (Gerente de Projetos - DPI - Produtos Alimentícios Fleischmann e Royal Ltda., Jundiaí, SP). Comunicação pessoal, 1988.

cola e a manifestação da doença procurou-se utilizar diferentes preparações obtidas a partir das suspensões. Os resultados evidenciaram a capacidade dessas preparações em interferir no desenvolvimento de *C. graminicola* e na manifestação da doença (Figuras 4 e 5). Porém, essas preparações também se mostraram termolábeis, como já comentado no item 5.1.

O efeito do filtrado das suspensões celulares, obtidas a partir do produto comercial, sobre o patógeno e sobre a manifestação da doença, evidenciou a possibilidade da existência de um metabólito ou complexo de metabólitos liberado pelas células da levedura. Pode-se supor que esse metabólito ou seu complexo agiria diretamente sobre o fungo e/ou desencadearia uma resposta protetora por parte da planta. Por outro lado, o uso de suspensões contendo células lavadas, demonstram a capacidade aparente dessas células em produzir e/ou liberar novamente o metabólito ou o complexo de metabólitos.

Visto as células de *S. cerevisiae*, contidas no produto comercial, serem produzidas através de multiplicações sucessivas em dornas de fermentação contendo meio aquoso complexo (Oliveira ¹), decidiu-se isolar as células de levedura, a partir do produto comercial, e mantê-las em meio de BDA. Os resultados mostraram a eficiência das suspensões dessas células isoladas bem como dos respectivos filtrados em reduzir o desenvolvimento de *C. graminicola* e a manifestação da doença. Com base nesses resultados, foi descartada a possibili-

dade da proteção das folhas ser devida a algum componente do meio aquoso utilizado a nível industrial. Por outro lado, evidenciou-se, uma vez mais, a produção de um metabólito ou complexo de metabólitos pelas células leveduriformes.

Diversos trabalhos mostram a produção de metabólitos tóxicos por microorganismos utilizados no controle biológico de fitopatógenos (BRIAN & HEMMING, 1945; BRIAN & McGOWAN, 1945; BRIAN et alii, 1946; GODTFREDSEN & VANGEDAL, 1965; DENNIS & WEBSTER, 1971). Por exemplo, um complexo da substância triconderminal 1, 2 e 3 produzida por *Trichoderma viride* Persoon ex Fries e distinta do antibiótico tricondermina mostra-se eficaz no controle de doenças causadas por fungos fitopatogênicos (DENNIS & WEBSTER, 1971). Além de antibióticos, *Trichoderma* spp. produzem enzimas tais como celobiase, quitinase, exo e endoglucanases que podem ser importantes componentes no controle biológico de fitopatógenos. No caso de fungos fitopatogênicos, esses metabólitos podem interferir ao nível da germinação dos esporos, formação de apressórios, etc.

Por outro lado, diversos trabalhos também evidenciam a possibilidade da indução de proteção em plantas contra fitopatógenos, pelo uso de metabólitos produzidos por microorganismos (DOKE et alii, 1987). Dessa maneira, com base nos resultados acima evidencia-se a possibilidade da ação direta do metabólito ou complexo de metabólitos sobre o desenvolvimento de *C. graminícola* bem como a possibilidade da indução de proteção nas folhas de milho.

5.4. INFLUÊNCIA DAS PREPARAÇÕES DE *S. cerevisiae* APLICADAS A DISTÂNCIA DO PONTO DE INOCULAÇÃO DO PATÓGENO, SOBRE O DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* E A MANIFESTAÇÃO DA ANTRACNOSE EM MILHO

De acordo com vários autores, a proteção induzida em diferentes sistemas hospedeiro-patógeno pode ser verificada a distância da área de aplicação do indutor (COHEN & KUČ, 1981; DEAN & KUČ, 1986a; DOKE et alii, 1987; HAMMERSCHMIDT et alii, 1976; HELLER & GESSLER, 1986). Dessa maneira, visando verificar a ocorrência ou não de uma proteção sistêmica induzida por preparações obtidas a partir do produto comercial ou células de levedura mantidas em meio de BDA, foram conduzidos os experimentos constantes do item 4.4.

A redução do desenvolvimento de *C. graminicola* e a manifestação da doença nas folhas em resposta ao tratamento com preparações de células de *S. cerevisiae* não foi observada a distância do sítio de aplicação das preparações, evidenciando, portanto a não ocorrência de uma proteção sistêmica (Figuras 6, 7, 8 e 9). Porém, os resultados não descartam a possibilidade da indução local nas folhas. Essa hipótese é suportada pelos resultados constantes no item 4.1., onde se verifica uma redução na área foliar lesionada bem como na esporulação do patógeno nos tecidos. Essa redução poderia ser devida a ativação de mecanismo(s) de resistência nas folhas de milho em decorrência da aplicação de *S. cerevisiae*. De

acordo com BELL (1981), a redução da área lesionada se constitui no principal resultado da proteção induzida.

5.5. EFEITO DAS PREPARAÇÕES DE *S. cerevisiae* NO DESENVOLVIMENTO DE *C. graminicola* "IN VITRO"

Os resultados evidenciam que as diferentes preparações de células de *S. cerevisiae* foram eficientes em inibir a germinação de conídios de *C. graminicola* "in vitro", (Figura 10). Esses resultados demonstram a possibilidade do efeito inibidor na germinação ocorrer mesmo na ausência do hospedeiro. Da mesma forma, os resultados ilustrados na Figura 11 sugerem a possibilidade da produção de um metabólito ou complexo de metabólitos que também agiria retardando o crescimento micelial do fungo "in vitro".

Dessa maneira, confirma-se a existência de um metabólito ou complexo de metabólitos, produzido por células da levedura, que interfere com a germinação dos conídios e possivelmente com o crescimento micelial de *C. graminicola*.

5.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora sejam necessários testes em condições de campo para se determinar a eficiência e estabilidade das

preparações de *S. cerevisiae* sob pressão natural de *C. graminicola*, o presente trabalho fornece subsídios que indicam a possibilidade do emprego dessas preparações no controle alternativo da antracnose em milho.

Por outro lado, mostra-se também de interesse o estudo da eficiência e modo de ação desses preparações contra outros fitopatógenos do milho bem como a possível caracterização do metabólito ou complexo de metabólitos presente nas suspensões de *S. cerevisiae*.

Finalmente, pesquisas genéticas com cepas de *S. cerevisiae* tem relatado a existência de uma sequência de gens plasmidiais (fator "killer"), responsável pela produção de substâncias tóxicas que agem antagonisticamente a outros microorganismos (YOUNG, 1987). Esse fator, ausente nos isolados de *S. cerevisiae* utilizados comercialmente, tem sido alvo de constante atenção, visto que a produção de células mutantes poderia auxiliar na manutenção de culturas puras das leveduras utilizadas nos tanques de fermentação industrial. Parece promissor, portanto, o fato de que cepas desse tipo poderiam ser selecionadas e testadas quanto a possível proteção de plantas de milho contra fitopatógenos.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho propiciaram as seguintes conclusões:

1. Suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir do produto comercial "Fermento Biológico Fresco", dependendo da concentração e intervalo de tempo entre a sua aplicação e a inoculação com o patógeno nas folhas de plantas de milho, reduzem o desenvolvimento de *Colletotrichum graminicola* bem como a manifestação da doença nas folhas.

2. Filtrados das suspensões celulares bem como suspensões contendo células lavadas de *S. cerevisiae*, obtidas a partir do produto comercial, também reduzem o desenvolvimento de *C. graminicola* e a manifestação da doença nas folhas.

3. Suspensões de células de *S. cerevisiae* bem como o filtrado dessas suspensões de células, isoladas a par

tir do produto comercial e mantidas em meio de batata-dextrose-ágar, aspergidas sobre folhas de milho também reduzem o desenvolvimento de *C. graminícola* e a manifestação da doença nas folhas.

4. A capacidade das diferentes suspensões de células e filtrados dessas suspensões em alterar o desenvolvimento do fungo e a manifestação da doença mostra-se termolábil.

5. A redução do desenvolvimento de *C. graminícola* e da manifestação da doença nas folhas em resposta ao tratamento com preparações de suspensões de células de *S. cerevisiae* não ocorre a distância do sítio de aplicação das preparações. Portanto, não se mostrando sistêmica. Porém, os resultados não descartam a possibilidade da indução de proteção local nas folhas tratadas, haja visto a redução da área foliar lesionada.

6. A redução do desenvolvimento de *C. graminícola* e da manifestação da antracnose pelo emprego dos filtrados celulares evidenciam que a presença física das células de *S. cerevisiae* não é necessária para a proteção das folhas. Portanto, um metabólito ou complexo de metabólitos termolábil, pode ser liberado nas suspensões.

7. A ação de *S. cerevisiae* sobre *C. graminicola* aparentemente mostra-se antagônica devido a antibiose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALASS, M. & LEVY, Y. Antagonistic relationships between *Helminthosporium maydis* and *Exserohilum turcicum* in corn plants and on artificial media. Can. J. Plant Path., Ottawa, 6: 313-17, 1984.
- BALMER, E. & PEREIRA, O.A.P. Doenças do milho. In: PATERNIANI, E. & VIEGAS, G.P., ed. Melhoramento e produção do milho. 2.ed. Campinas, Fundação Cargill, 1987. v.2, cap. 14, p.597-633.
- BASHI, E. & FOKKEMA, N.J. Environmental factors limiting growth of *Sporobolomyces roseus*, an antagonist of *Cochliobolus sativus*, on wheat leaves. Trans. Br. Mycol. Soc., London, 68: 17-25, 1977.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. Ann. Rev. Plant Physiol., Palo Alto, 32: 21-81, 1981.
- BERETTA, M.J.G.; MARTINS, E.M.F.; MORAES, W.B.C. Induced protection to *Hemileia vastatrix* at a distance from the site of the inducing action in coffee plants. Summa Phytopath., Piracicaba, 3(1): 66-70, jan/fev. 1977.
- BRIAN, P.W. & HEMMING, H.G. Gliotoxin, a fungistatic metabolic product of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol., London, 32: 214-20, 1945.

- BRIAN, P.W. & MCGOWAN, J.C. Viridin: a highly fungistatic substance produced by *Trichoderma viride*. Nature, London, 156: 144, 1945.
- BRIAN, P.W.; CURTIS, P.J.; HEMMING, H.G.; MCGOWAN, J.G. The production of viridin by pigment forming strains of *Trichoderma viride*. Ann. Appl. Biol., London, 33: 190-200, 1946.
- BROWN, N.A. Experiments with Paris daisy and rose to procure resistance to crown gall. Phytopathology, St. Paul, 13: 87-99, 1923.
- CARROL, R.B. & LUKEZIC, F.L. Induced resistance in alfalfa to *Corynebacterium insidiosum* by prior treatment with avirulent cells. Phytopathology, St. Paul, 62: 555-63, 1972.
- CARSON, M.L. & HOOKER, A.L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. Phytopathology, St. Paul, 71(11): 1190-1196, 1981.
- CARUSO, F. & KUČ, J. Protection of watermelon and muskmelon against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Phytopathology, St. Paul, 67: 1258-98, 1977.
- CARUSO, F. & KUČ, J. Induced resistance of cucumber to anthracnose and angular leaf spot by *Pseudomonas lachrymans* and *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Path., London, 14: 191-201, 1979.
- COHEN, Y. & KUČ, J. Evaluation of systemic resistance to blue mold induced in tobacco leaves by prior stem inoculation with *Peronospora hyoscyami* f.sp. *tabacina*. Phytopathology, St. Paul, 71(8): 783-7, 1981.

- COOK, R.J. & BAKER, F. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. St. Paul, Minnesota, U.S.A., The American Phytopathology Society, 1983. 539p.
- CRUICKSHANK, I.A.M. & MANDRYK, M. The effect of stem infestation of tobacco with *Peronospora tabacina* Adam on foliage reaction to blue mold. J. Aust. Inst. Agric. Sci., Parkville, 26: 369-72, 1960.
- DAVIS, K.R.; LYON, G.D.; DARVILL, A.G.; ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XXV. Endopolygalacturonic acid lyase from *Erwinia carotovora* elicits phytoalexin accumulation by releasing plant cell wall fragments. Plant Physiol., Lancaster, 74: 52-60, 1984.
- DEAN, R.A. & KUČ, J. Induced systemic protection in plants. Trends in Biotechnology, Lexington, 3(5): 125-9, 1985.
- DEAN, R.A. & KUČ, J. Induced systemic protection in cucumber: Effects of inoculum density on symptom development caused by *Colletotrichum lagenarium* in previously infected and uninfected plants. Phytopathology, St. Paul, 76(2): 186-9, 1986a.
- DEAN, R.A. & KUČ, J. Induced systemic protection in cucumbers: the source of the "signal". Physiol. Mol. Plant Pathol., London, 28: 227-33, 1986b.
- DENNIS, C. & WEBSTER, J. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. Trans. Br. Mycol. Soc., London, 57(1): 25-39, 1971.

- DOKE, N.; RAMIREZ, A.V.; TOMIYAMA, . Systemic induction of resistance in potato plants against *Phytophthora infestans* by local treatment with hyphal wall components of the fungus. J. Phytopathology, Berlin, 119: 232-9, 1987.
- ELLISTON, J.; KUČ, J.; WILLIAMS, E. Induced resistance to bean anthracnose at a distance from the site of the inducing interaction. Phytopathology, St. Paul, 61: 1110-2, set. 1971.
- ELLISTON, J.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.B. Protection of *Phaseolus vulgaris* against anthracnose by *Colletotrichum* species nonpathogenic to bean. Phytopath. Z., Berlin, 86: 117-26, 1976.
- ELLISTON, J.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.; RAHE, J. Relation of phytoalexin accumulation to local and systemic protection of bean against anthracnose. Phytopath. Z., Berlin, 88: 114-30, 1977.
- GODTFREDSEN, W.O. & VANGEDAL, S. Trichodermin, a new sesquiterpene antibiotic. Acta Chem. Scand., Stockholm, 19: 1088-02, 1965.
- GOODMAN, R.N. The protection of apple stem tissue against *Erwinia amylovora* infection by avirulent strains and three other bacterial species. Phytopathology, St. Paul, 57: 22-4, 1967.
- GRAHAM, T.L.; SEQUEIRA, L.; HUANG, T.S.R. Bacterial lipopoly-saccharides as inducer of disease resistance in tobacco. Appl. Environ. Microbiol., Washington, 34: 424-34, 1977.

- GUEDES, M.E.; RICHMOND, S.; KUČ, J. Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum lagenarium* and onset of flowering and fruiting. Physiol. Plant Path., London, 17: 229-33, 1980.
- HAHN, M.G. & ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XIV. Isolation and partial characterization of an elicitor from yeast extract. Plant Physiol., Lancaster, 62(1): 107-11, jul. 1978.
- HAMMERSCHMIDT, R. Lignification and related phenolic metabolism in the induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium* and *Cladosporium cucumerinum*. Ph.D. dissertation. University of Kentucky. 1980. 150p.
- HAMMERSCHMIDT, R. & KUČ, J. Enhanced peroxidase activity and lignification in the induced systemic protection of cucumber. Phytopathology, St. Paul, 70: 689, 1980.
- HAMMERSCHMIDT, R. & KUČ, J. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiol. Plant Path., London, 20: 61-71, 1982.
- HAMMERSCHMIDT, R.; ACRES, S.; KUČ, J. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* and *Cladosporium cucumerinum*. Phytopathology, St. Paul, 66: 790-3, jun. 1976.
- HELLER, W.E. & GESSLER, C. Induced systemic resistance in tomato plants against *Phytophthora infestans*. J. Phytopath. Berlin, 116: 323-8, 1986.
- I.E.A. Mercado de produtos: Milho. Prognóstico agrícola 88/89, São Paulo, Instituto de Economia Agrícola, v.1, cap. 5, p.56-63.

- JAMIL, F.F. & NICHOLSON, R.L. Susceptibility of corn to isolates of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to other grasses. Plant Disease, St. Paul, 71: 809-10, 1987.
- JENNS, A.E. & KUČ, J. Graft transmission of systemic resistance of cucumber to anthracnose induced by *Colletotrichum lagenarium* and tobacco necrosis virus. Phytopathology, St. Paul, 69: 753-6, 1979.
- JENNS, A.E. & KUČ, J. Characteristics of anthracnose resistance induced by localized infection with tobacco necrosis virus. Physiol. Plant Path., London, 17: 81-91, 1980.
- JENNS, A.E.; CARUSO, F.L.; KUČ, J. Nonspecific resistance to pathogens induced systemically by local infection of cucumber with tobacco necrosis virus, *Colletotrichum lagenarium* (Pass) Ell. et Halst or *Pseudomonas lachrymans* (Sm. et Bryan) Carsner. Phytopath. Mediterr., Florence, 18: 129-34, 1979.
- KLEMENT, Z. & GOODMAN, R.N. The hypersensitive reaction to infection by bacterial plant pathogens. Ann. Rev. Phytopath., Palo Alto, 5: 17-44, 1967.
- KUČ, J. Plant protection by the activation of latent mechanism for resistance. Neth J. Plant Path., Wageningen, 83(Suppl. 1): 463-71, 1977.
- KUČ, J. Plant immunization - mechanisms and practical implications. In: WOOD, R.K.S., ed. Active defense mechanism in plants. New York, Plenum Press, 1982. p.157-78.

- KUČ, J. Induced systemic resistance to plant disease and phytointerferons - are they compatible? Fitopat. bras., Brasília, 10(1): 17-40, fev. 1985.
- KUČ, J. Plant immunization and its applicability for disease control. In: CHET, H., ed. Offprints from innovative approaches to plant disease control. U.S.A., John Wiley & Sons, Inc., 1987. cap. 12, p.255-74.
- KUČ, J.; SHOCKLEY, G.; KEARNEY, K. Protection of cucumber against *Colletotrichum lagenarium* by *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Plant Pathol., London, 7: 195-200, 1975.
- LEBEN, C. Influence of bacteria from healthy cucumber leaves on two leaf diseases of cucumber. Phytopathology, St. Paul, 54: 405-8, 1964.
- LOVREKOVICH, L. & FARKAS, G.L. Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. Nature, London, 205: 823-4, 1965.
- LOZANO, J.C. & SEQUEIRA, L. Prevention of the hypersensitive reaction in tobacco leaves by heat-killed cells of *Pseudomonas solanacearum*. Phytopathology, St. Paul, 68: 875-7, 1970.
- LUZ, W.C. da & BERGSTROM, G.C. Interactions between *Cochliobolus sativus* and *Pyrenophora tritici - repentis* on wheat leaves. Phytopathology, St. Paul, 77(9): 1355 -60, 1987.
- MARTINS, E.M.F.; SILVA, S.R. da; MORAES, W.B.C. Fluorocromação - Método para avaliação da germinação de esporos de fungos na superfície foliar. Arq. Inst. Biol., São Paulo, v. 55 (Supl. 1a Reunião Anual): p.1-87, 1988 (Resumo).

- MARTINS, E.M.F.; BERETTA, M.J.G.; ROVERATTI, D.S.; MORAES, W.B.C. Comparative induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants by non-specific inducers from different fungal and bacterial origins. Fitopat. bras., Brasília, 10(3): 521-9, out. 1985.
- McINTYRE, J.L.; KUČ, J.; WILLIAMS, E.B. Protection of Bartlett pear against fire blight with deoxyribonucleic acid from virulent and avirulent *Erwinia amylovora*. Physiol. Plant Path., London, 7: 153-70, 1975.
- McKINNEY, H.H. Mosaic diseases in the Canary Islands West Africa and Gibraltar. J. Agric. Res., Washington, 39: 557-78, 1929.
- METRAUX, J.P. Local and systemic induction of chitinase in cucumber plants in response to viral, bacterial and fungal infections. Physiol. Plant Path., London, 28: 161-9, 1986.
- MORAES, W.B.C.; MARTINS, E.M.F.; MUSUMECI, M.R.; BERETTA, M. J.G. Induced protection to *Hemileia vastatrix* in coffee plants. Summa Phytopath., Piracicaba, 2(1): 39-43, jan./fev./mar. 1976.
- MÜLLER, K. & BÖRGER, H. Experimentelle Untersuchungen über die *Phytophthora* resistenz der Kartoffel. Arb. Biol. Reichsanst. Land Fortwirtsch., Berlin, 23: 189-231, 1940.
- NELSON, R.R. & TUNG, G. Cross protection by race 0 against race T of *Helminthosporium maydis*. Plant Disease Rept., St. Paul, 57(11): 971-3, 1973.

- NICHOLSON, R.L. & WARREN, H.L. Criteria for evaluation of resistance to maize anthracnose. Phytopathology, St. Paul, 66: 86-90, 1976.
- OUCHI, S.; OKU, H.; HIBINO, C.; AKIYAMA, I. Induction of accessibility and resistance in leaves of barley by some races of *Erysiphe graminis*. Phytopath. Z., Berlin, 79: 24-34, 1974.
- OUCHI, S.; OKU, H.; HIBINO, C. Localization of induced resistance and susceptibility in barley leaves inoculated with the powdery mildew fungus. Phytopathology, St. Paul, 66: 901-05, 1976.
- PASCHOLATI, S.F.; MORAES, W.B.C.; FIGUEIREDO, M.B.; OLIVEIRA, A.R. Induced protection in melon plants against *Mycosphaerella melonis* by prior inoculation with *Helminthosporium carbonum* or heat-inactivated *M. melonis*. Fitopat. bras., Brasília, 11(3): 507-14, out. 1986.
- PEARCE, R.B. & RIDE, J.P. Specificity of the induction on the lignification response in wounded wheat leaves. Physiol. Plant Path., London, 16: 197-204, 1980.
- ROSS, A.F. Systemic acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. Virology, New York, 14: 329-39, 1961.
- ROSS, A.F. Systemic effects of local lesion formation. In: BEEMSTER, A.B.R. & DIGIKSTRA, J., ed. Viruses of plants. Amsterdam, North-Holland Publ., 1965, p.127-50.

ROVERATTI, D.S.; TEIXEIRA, A.R.R.; MORAES, W.B.C. *Bacillus thuringiensis* - A new perspective for an induced protection to coffee leaf rust. J. Phytopathology, Berlin, 1989 (No prelo).

SÃO PAULO (estado), Secretaria da Agricultura e Abastecimento. Programa Integrado de Pesquisa: Milho e Sorgo Granífero. São Paulo, 1985. 22p.

SEQUEIRA, L. The acquisition of systemic resistance by prior inoculation. In: DALY, J.M. & URITANI, I., ed. Recognition and Specificity in plant host-parasite. Tokyo, Japan Sci. Soc., 1979. p.231-49.

SEQUEIRA, L. Mechanism of induced resistance in plants. Ann. Rev. Microbiol., Palo Alto, 37: 51-79, 1983.

SHURTLEFF, M.C., ed. Compendium of corn diseases. 2.ed. St. Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society, 1980. 105p.

SIEGEL, S.M. Non-enzymic macromolecules as matrices in biological synthesis: the role of polysaccharides in peroxidase - catalyzed lignin polymer formation from eugenol. J. Am. Chem. Soc., Washington, 79: 1628-32, 1957.

SILVEIRA, A.P.; FIGUEIREDO, M.B.; CRUZ, B.P.B. Ocorrência da antracnose no milho no Estado de São Paulo. O Biológico, São Paulo, 31: 192-4, 1965.

- SMITH, E.F.; BROWN, N.A.; TOWNSEND, C.O. Crown gall of plants: its cause and remedy. U.S. Dept. Ag. Bur. Plant Indus. Bull., 213: 1911.
- SULE, S. Induced resistance in tomato against *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by prior inoculation with *Pseudomonas syringae* pathovars. J. Phytopathology, Berlin, 122: 343-50, 1988.
- TUITE, J. Microscopic Technics. In: Plant Pathological Methods fungi and bacteria. Burgess Publishing Company. Minneapolis, 1969.
- WILLIAMSON, M.A. & FOKKEMA, N.J. Phyllosphere yeasts antagonize penetration from apressoria and subsequent interaction of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. Neth. J. Pl. Pathology, Wageningen, 91: 265-76, 1985.
- YOUNG, T.W. Killer yeasts. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S., ed. The yeasts. 2.ed., London, Academic Press, 1987. vol. 2, cap. 6, p.131-64.