



EDGAR ZANOTTO

**PROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE AGENTES DE
CONTROLE BIOLÓGICO PARA MANEJO
DOENÇAS EM MILHO COM FOCO EM
REDUÇÃO DE GRÃOS ARDIDOS**

**LAVRAS-MG
2014**

EDGAR ZANOTTO

**PROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE
BIOLOGICO PARA MANEJO DOENÇAS EM MILHO COM FOCO EM
REDUÇÃO DE GRÃOS ARDIDOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

Dr. José da Cruz Machado
Dr. Itamar Soares Melo
Dr. Renzo Garcia Von Pinho
Coorientadores

**LAVRAS-MG
2014**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Zanotto, Edgar .

Combinação do controle químico e biológico no manejo de
doenças em milho com foco em redução de grãos ardidos / Edgar
Zanotto. – Lavras : UFLA, 2015.

48 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de
Lavras, 2014.

Orientador(a): Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de
Medeiros.

Bibliografia.

1. Micotoxinas. 2. Food safaty. 3. Streptomyces. 4. Fusarium
verticilioides. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

EDGAR ZANOTTO

**PROSPECÇÃO E SELEÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE
BIOLOGICO PARA MANEJO DOENÇAS EM MILHO COM FOCO
EM REDUÇÃO DE GRÃOS ARDIDOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós Graduação em
Agronomia/Fitopatologia, área de
concentração em Fitopatologia para a
obtenção do título de Mestre

Aprovada em 15 de agosto de 2014.

Dra. Dagma Dionisia da Silva Embrapa

Dr. Luis Roberto Batista UFLA

Dr. José da Cruz Machado UFLA

Prof. Dr. Flávio Henrique Vasconcelos de Medeiros
Orientador

LAVRAS-MG

2014

Resumo

Os grãos ardidos reduzem a qualidade do milho e são aceitáveis valores máximos de 2% de grãos ardidos para a exportação e de 6% para a comercialização no mercado interno. Além disso, causam redução no valor comercial dos grãos que, normalmente, é descontado no momento da entrega nos armazéns. Os principais agentes relatados são *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em produção de grãos ardidos no campo. Já em pós-colheita, os principais patógenos são fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. O objetivo deste trabalho foi encontrar agentes de controle biológico para fazer parte do manejo de doenças no milho, com foco na redução de grãos ardidos. A prospecção dos isolados foi realizada pelo método de iscas naturalmente infectadas. Foi realizado um pré-teste nos isolados prospectados de inibição direta do fungo *F. verticillioides*. Os isolados obtidos na etapa anterior, juntamente com isolados fornecidos pela Embrapa foram avaliados para a capacidade de proteção de grãos inoculados com *A. flavus* e *F. verticillioides*. Para avaliar a eficiência em campo, foram realizados quatro experimentos, em duas áreas e dois anos agrícolas diferentes. Os antagonistas selecionados nas etapas anteriores foram aplicados na forma de suspensão, em dois estágios de desenvolvimento da planta. A primeira foi no início do estágio V9-10 e a segunda em pré-pendoamento (estádio R1). Após 10 dias da emissão do estilo estigma, *F. verticillioides* foi aspergido no estilo estigma. Os tratamentos usados no campo foram, PRIORI XTRA + PRIORI XTRA, Streptomyces + PRIORI XTRA, PRIORI XTRA + Streptomyces, BIOUFLA2+BIOUFLA2, Streptomyces + Streptomyces, PRIORI XTRA, PRIORI XTRA + BIOUFLA2, BIOUFLA2 + PRIORI XTRA e TESTEMUNHA. Os experimentos foram em blocos casualizados com quatro repetições para cada tratamento. Foram avaliadas as doenças de milho no campo, a produtividade da cultura, análise de grãos ardidos e sanidade de grãos. Obtiveram-se resultados consistentes nos experimentos montados. O uso do actinomiceto *Streptomyces araujoniae* no manejo da cultura do milho demonstrou ótimos resultados, tanto para doenças foliares, quanto à redução de grãos ardidos.

Palavras chave: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, micotoxinas, *Zea mays*

Abstract

Rot grains reduces corn quality and maximum value acceptable are 2% for exports and 6% for internal market. Moreover, they cause reduction in the commercial value of grains which usually is deducted at the time of delivery to storage. *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Fusarium graminearum* and *Fusarium verticillioides* has been described as main agents to produce rot grains on field. In another hand, *Aspergillus* and *Penicillium* are the main cause after harvest. The objective of this study was to find biological control agents to management of diseases in corn, focusing on the reduction of rot grains. The prospection of the isolates was performed by the method of naturally infected bait. It was conducted a pretest in prospected isolates from direct inhibition against *F. verticillioides*. The isolates obtained in the previous step, along with isolated provided by Embrapa were evaluated for grain protection capability inoculated with *A. flavus* and *F. verticillioides*. To assess the field efficiency, four experiments were carried out in two different areas and two seasons. The antagonists selected in the previous steps were applied as a suspension in two stages of plant development. The first application was in the early stage V9-10 and the second pre-silking(R1 stage). After 10 days of the issue of stigma style *F. verticillioides* was sprinkled on the stigma style. The treatments, in the field, consisted by PRIORI XTRA + PRIORI XTRA, Streptomyces + PRIORI XTRA, PRIORI XTRA + Streptomyces, BIOUFLA2+BIOUFLA2, Streptomyces + Streptomyces, PRIORI XTRA, PRIORI XTRA + BIOUFLA2, BIOUFLA2 + PRIORI XTRA and Control. The experiments were a randomized block with four replications for each treatment. Were evaluated the corn diseases in the field, culture productivity, rot grains and sanity of grains. The results showed consistent on the experiments carried out. The use of actinomycetes *Streptomyces araujoniae* in the management of the corn crop has shown great results for foliar diseases, as well for the reduction of rot grains.

Key words: *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, mycotoxins, *Zea mays*

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
<u>2</u>	<u>OBJETIVO GERAL.....</u>	<u>7</u>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
<u>3</u>	<u>MATERIAL E METODOS</u>	<u>8</u>
3.1	PROSPECÇÃO DE ISOLADOS	8
3.2	PRÉ-TESTE DE ISOLADOS PROSPECTADOS	8
3.3	SELEÇÃO DE AGENTES DE CONTROLE <i>IN VITRO</i>	9
3.4	EXPERIMENTOS DE CAMPO	10
3.4.1	MONTAGEM E MANEJO DOS EXPERIMENTOS DE CAMPO	10
3.4.2	AVALIAÇÕES DAS DOENÇAS NO CAMPO.....	13
3.4.3	AVALIAÇÃO DE PRODUTIVIDADE E GRÃOS ARDIDOS	14
3.4.4	AVALIAÇÃO DE SANIDADE DOS GRÃOS.....	14
<u>4</u>	<u>RESULTADOS</u>	<u>15</u>
4.1	CEPAS ISOLADAS NA PROSPECÇÃO.....	15
4.2	PRÉ-TESTE DE CEPAS PROSPECTADAS.....	15
4.3	RESULTADOS DA SELEÇÃO <i>IN VITRO</i>	16
4.4	RESULTADOS NO CONTROLE DE DOENÇAS NO CAMPO.....	18
4.5	RESULTADOS PÓS-COLHEITA.....	27
4.5.1	PRODUTIVIDADE	27
4.5.2	MASSA DE MIL GRÃOS.....	30
4.5.3	PERCENTAGEM DE GRÃOS ARDIDOS.....	30
4.5.4	RESULTADO DE ANÁLISE DE BLOTTER TESTE	32

5 **CONSIDERAÇÕES FINAIS****35**

6 **REFERÊNCIAS.....****36**

1 Introdução

O milho (*Zeamays L.*) está entre os mais importantes grãos cultivados no mundo, em termos de produtividade e uso (PEREIRA et al., 2005). O Brasil desponta como um dos grandes produtores mundiais, aumentando constantemente os patamares de produtividade, tendo atingido 79 milhões de toneladas em 2013 (CONAB, 2013).

A cultura, ao longo dos anos, tem adquirido grande importância dentro do sistema produtivo, não apenas no aspecto econômico, mas também como importante componente no sistema de rotação/sucessão de culturas (SWARTZ & MARCHIORO, 2009). Entretanto, a partir do final de década de 1990, as doenças têm se tornado uma grande preocupação e relatos de perdas na produtividade devido ao ataque de patógenos têm sido cada vez mais frequentes nas principais regiões produtoras do país (COSTA et al., 2009).

Diversas doenças podem acometer a cultura do milho e cada uma representa um desafio aos produtores e pesquisadores que buscam estratégias de controle. Dentre as doenças do milho, um grande desafio são os grãos ardidos e, conseqüentemente, as micotoxinas que, até 2015, terão que seguir uma regulamentação muito severa. Segundo estatística do laboratório de análise de micotoxinas da Universidade Federal de Santa Maria, três a cada quatro amostras têm contaminação (LAMIC, 2012) em níveis superiores aos aceitáveis de acordo com a Lei RDC07/2011 (ANVISA, 2011), que entra completamente em vigor em 2015.

As micotoxinas são compostos produzidos pelo metabolismo secundários de fungos filamentosos e são tóxicos ao homem e aos animais, mesmo em baixas concentrações (BATISTA, 2010). Esses fungos também podem atuar de forma deletéria na qualidade dos grãos e são aceitáveis valores máximos de 2% de grãos ardidos para a exportação e de 6% para a comercialização no mercado interno (MENDES, 2009), sendo um grande

indicador da presença de micotoxinas. Além disso, causam redução no valor comercial dos grãos (YU et al, 2010) que, normalmente, é descontado no momento da entrega nos armazéns.

Os principais agentes relatados são *Colletotrichum graminicola*, *Stenocarpella maydis*, *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* (REIS et al., 2004) em produção de grãos ardidos no campo. Já em pós-colheita, os principais patógenos são fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (MEGAN., 2003). Já os fungos mais relatados em termos de produção de micotoxinas são *F. verticillioides*, para fumonisinas e *A. flavus*, para aflatoxinas.

Os compostos tóxicos produzidos por estes fungos demonstraram os efeitos nocivos desses metabólitos, notadamente efeitos cancerígenos e/ou tóxicos (MILICEVIC et al 2010). Atualmente, são conhecidas, aproximadamente, 400 micotoxinas de 100 fungos diferentes (TSITSIGIANNIS et al., 2012) e esses compostos estão presentes em, aproximadamente, 25% da produção de *commodities* do mundo (MEDEIROS, 2012). O dano associado à concentração de micotoxina existente no grão não está restrito ao seu consumo *in natura*, mas também aos seus, pelo menos, 600 alimentos derivados diretos do grão, sendo 500 deles destinados ao consumo humano (PINAZZA, 1993).

Dentre as micotoxinas de maior impacto para a saúde humana e animal, associadas ao milho e aos seus derivados (ROMERO et al., 2010; CORONEL et al., 2010), estão as aflatoxinas (sintetizadas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*) e as fumonisinas dos tipos FB1, FB2 e FB3 (sintetizadas por *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg (Ex *F. moniliforme* Sheldon) (YAZAR & OMURTAG, 2008)) (GIORNI et al., 2008; ZUCCHI & MELO, 2010) (GORYACHEVA et al., 2010). A produção de micotoxina começa por uma eficiente colonização do grão pelo fungo e este processo começa já no campo, durante a fase de maturação dos grãos, e prossegue nas etapas seguintes, durante a colheita, a secagem, o armazenamento, o transporte e o processamento (PITT, 2000; GIORNI et al., 2008).

No campo, a incidência do grão ardido, indicativo de presença de micotoxina, pode ser influenciada pelas condições ambientais (BHAT, 2008), pelo híbrido plantado e pelo manejo da cultura adotado (COSTA et al., 2009). O acúmulo de micotoxinas no campo está relacionado a estresse sofrido pela planta durante o desenvolvimento da cultura (BACON, 2001). Na pós-colheita, durante o armazenamento e o processamento, as condições de umidade do grão acima de 13% favorecem o desenvolvimento desses fungos (SANTÚRIO, 2003). Entretanto, mesmo em baixas umidades, fungos do gênero *Aspergillus* e *Penicilium* podem se desenvolver e produzir micotoxinas (JOUANY, 2007).

Técnicas de controle químico com diferentes fungicidas e número de aplicações não têm mostrado resultados satisfatórios para a redução de *F. verticillioides* e *A. flavus* (LANZA, 2012). Nos Estados Unidos, Broders et al. (2007) estudaram a sensibilidade de populações de *Fusarium graminearum* a defensivos agrícolas registrados para o milho e verificaram que apenas o fludioxonil apresentava controle da maioria dos isolados, sendo que algumas populações já se apresentavam resistentes também a estes produtos. Mesmo que o produto se mostre potencialmente eficiente nas condições brasileiras, há limitações ao seu uso e, na pós-colheita, sua utilização pode, inclusive, induzir os fungos a produzir maiores concentrações de micotoxinas (MÜLLENBORN et al., 2008).

Na busca por fontes de resistência a grãos ardidos, Jouany (2007) identificou linhagens promissoras, mas estas características ainda não foram incorporadas a híbridos comerciais por não terem produtividade competitiva. Entretanto, há diferenças em susceptibilidade à ocorrência de grãos ardidos (PINTO, 2006) e produção de fumonisina (CAMARGOS et al., 2000) em híbridos comerciais.

Mendes (2009) apresenta um quadro de resistência de híbridos comerciais à ocorrência de grãos ardidos e este quadro se mantém muito semelhante àquele disponibilizado pela Embrapa Milho e Sorgo

(www.cnpms.embrapa.br). No quadro disponibilizado pela Embrapa, os híbridos transgênicos para resistência a lepidópteros apresentam maior resistência ao conteúdo de grãos ardidos em relação àqueles convencionais, porém, a tecnologia para o controle de lepidópteros está perdendo sua resistência. Essa redução dos grãos ardidos está condicionada à redução de aberturas para a colonização dos fungos feita pelos lepidópteros, não reduzindo de modo satisfatório a quantidade de grãos ardidos.

Uma alternativa para aumentar a eficiência e reduzir as chances de seleção de populações de fungos resistentes aos fungicidas é o controle biológico. Quando comparado aos produtos químicos, os agentes de controle biológico têm a vantagem de apresentar a habilidade de colonizar a semente internamente, podendo, assim, atuar em diferentes fungos que estabeleceram infecções sistêmicas onde esporos ou micélio do fungo foram carregados para dentro do grão (CAVAGLIERIET al., 2005), o que dificilmente seria conseguido quando se aplica um fungicida protetor.

No controle de doenças em pós-colheita de frutas e verduras, o controle biológico vem sendo amplamente estudado e foi revisado por Sharma et al. (2009). No entanto, para o controle de doenças pós-colheita em grãos, ainda são escassos os trabalhos. Zucchi & Melo (2009) fizeram uma revisão sobre os potenciais microrganismos e estratégias adotadas para os agentes de biocontrole de fungos causadores de grãos ardidos e produtores de micotoxinas no mundo, demonstrando que o controle biológico tem se apresentado como alternativa mais efetiva do que os diversos fungicidas agrícolas existentes no mercado com ação em pré e em pós-colheita.

Ehrlich & Cotty (2004) demonstraram, em condições de campo, a redução da contaminação por aflatoxinas em sementes de algodão por meio do emprego do fungo *A. flavus* isolado AF36 não produtor de aflatoxina. Outro *A. flavus* não produtor de micotoxina foi submetido a um estudo, durante dois anos, para determinar sua eficácia na redução da contaminação por aflatoxinas em milho sob diferentes aplicações do antagonista (DORNER, 2009). Os estudos resultaram no primeiro produto a ser comercializado para

esta finalidade, o isolado NRRL 21882, comercializado nos EUA pela Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. No Brasil, o mesmo produto está registrado para uso na cultura do amendoim e será comercializado pela Biosphere Indústria e Comércio de Insumos Agrícolas Ltda. (AGROFIT, 2013), porém, não tem mostrado redução em número de grãos ardidos, um dado que é muito importante, considerando a legislação brasileira.

O *A. Flavusage* por competição, colonizando os sítios de infecção do grão, não permitindo assim, que a espécie do fungo produtor de micotoxina se estabeleça. Porém, existem outras estratégias que podem ser adotadas *Bacillus* e actinomicetos, por exemplo, podem atuar por antibiose direta, pois são grandes produtores de antibióticos (SILO-SUH,1994; LEIFERT,1995; DOUMBOU, 2001), diferente das leveduras.

A indução de resistência também pode estar presente nos mecanismos de ação desses agentes de controle biológico. Em se tratando especificamente do controle da micotoxina, vários são os exemplos de sucesso da utilização do controle biológico, no intuito de degradar o produto tóxico em pós-colheita (CAST, 2003), inibir sua síntese (YAN et al., 2004) ou, simplesmente, reduzir a população do fungo produtor de micotoxina associado ao grão (PEREIRA et al.,2010) ou, ainda, também ter vários modos de ação simultaneamente (ZUCCHI, 2008; FRAVEL, 2005).

Bactérias do gênero *Bacillus* podem competir pelo mesmo sítio de infecção que *F. verticillioides* sem causar danos à planta, reduzindo a taxa de transmissão vertical, qual fungicidas sistêmicos não têm mostrado efeito significativo (BACON, 2001).

O uso do controle biológico não deve ser suficiente para o controle de fungos micotoxicogênicos e suas micotoxinas (MEDEIROS, 2012), mas é uma ferramenta eficaz na integração de estratégias para controle de micotoxinas. Especificamente fumonisinas já mostraram bons resultados em tratamento de sementes (PEREIRA,2007), porém, em aplicações na parte aérea ainda não existem estudos de combinações químico-biológicas, com grande potencial de melhorar o espectro de ação, reduzir o número de

aplicações e aumentar o período residual, podendo o poder residual persistir até em pós-colheita.

Portanto, novas técnicas de manejo de grãos ardidos e da consequente produção de micotoxinas estão sendo altamente requisitadas.

Nesse contexto, os agentes de biocontrole têm se mostrado uma alternativa viável, de baixo custo e com poucas implicações para a saúde humana e o meio ambiente. Têm, ainda, a possibilidade de ter efeito sobre outras doenças durante o ciclo da cultura, por agirem normalmente com mais de um modo de ação, que pode entrar como um auxiliar ao tratamento que já é feito com fungicidas químicos para doenças foliares. Com o auxílio deste trabalho poderão fazer parte do manejo da cultura do milho, junto com os fungicidas químicos, auxiliando até em doenças foliares, mas, principalmente, grãos ardidos, podendo até reduzir as quantidades de micotoxinas consequentemente presentes nos grãos de milho.

2 Objetivo Geral

Encontrar agentes de controle biológico para fazer parte do manejo de doenças no milho, com foco na redução de grãos ardidos.

2.1 Objetivos Específicos

- Selecionar isolados que demonstrem capacidade de inibir o desenvolvimento de *F. verticillioides* e *A. Flavus* em sementes inoculadas com cada um dos fungos.
- Avaliar, em campo, a eficiência dos antagonistas promissores na ocorrência de grãos ardidos e o efeito nas demais doenças no milho.
- Avaliar a sinergia entre os agentes de controle biológico e o controle químico adotado.

3 Material e Metodos

3.1 Prospecção de Isolados

A busca dos isolados antagonistas foi feita pelo isolamento de bactérias capazes de crescer em baixa atividade de água. A prospecção foi realizada pelo método de iscas naturalmente infectadas (GHINI&KIMATI, 1989). Os grãos contaminados foram distribuídos em solos supressivos com relação à ocorrência de grãos ardidos e os solos foram coletados em diversas localidades onde se pratica o plantio direto de milho. O solo foi transferido para placas de Petri na proporção de 10 g de sementes (iscas) para 100 g de solo com vários níveis de umidade (25%,50%,75% e 100% cc) e o conjunto mantido em caixas tipo germbox, por 5 dias. Depois, as iscas foram lavadas com água destilada e transferidas para placas de Petri contendo ágar-água com restrição hídrica ($a_w=0,96$; 128,2mLglicerol/ L de meio). As placas ficaram incubadas, por uma semana, a 20°C. Após esse período, as sementes foram lavadas em solução salina 0,85% e agitadas, em tubo tipo falcon, em agitador de tubos tipo vortex, por 1 minuto. A suspensão, então, foi diluída em série (10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3} ; 10^{-4} e 10^{-5}) e plaqueada em meio CMA ((fubá 30g+ ágar 20g)/L) com restrição hídrica ($a_w=0,96$; 128,2 mL glicerol/ L de meio). Essas placas foram incubadas, a 28°C, por cinco dias. Todas as colônias obtidas foram repicadas, numeradas e armazenadas em peptona-glicerol - 80°C, até o uso.

3.2 Pré-teste de Isolados Prospectados

Para passar para a próxima fase, juntamente com isolados trazidos da Embrapa, foi feito um pré-teste de inibição direta do fungo *F.verticilioides*, para reduzir o número de tratamentos e viabilizar a montagem dos experimentos. Em um lado da placa de Petri de 9 mm foi colocado um disco contendo o fungo e, na outra lateral, foi colocado um disco contendo cada isolado prospectado no ensaio anterior. Foram selecionadas, para a próxima

fase de ensaios, apenas as cepas que criaram algum alo de inibição, indicando uma ação direta sobre o patógeno, que pode ser um dos métodos de controle mais importantes no controle biológico.

3.3 Seleção de Agentes de Controle *in vitro*

Os dois isolados obtidos na etapa anterior, juntamente com quatro isolados fornecidos pela Embrapa, incluindo um de actinomiceto *Streptomyces araujoniae* obtido por Zucchiet al. (2008), foram avaliados para a capacidade de proteção de grãos inoculados com *A. Flavus* (obtido da coleção do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Lavras) e *F. verticillioides* (obtido da coleção do Laboratório de Micologia no Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Lavras).

Os patógenos eram cultivados e preservados em placas de Petri com meio de cultura BDA (BEEVER,R.E., 1970) e incubados em BOD, com 12 horas de fotoperíodo, a 27°C. Os antagonistas foram preservados em meio peptona-glicerol 10% e armazenados em freezer, a -80°C, e foram cultivados em placas de Petri com meio YPD (10 g extrato de levedura, 20 g peptona bacteriológica, 20 g dextrose, 20 g ágar/l de meio) e incubados a 27°C.

A seleção dos antagonistas foi feita colocando-se grãos de canjica de dois lotes diferentes, que foram desinfestados superficialmente, imergindo os grãos em álcool (70% v/v) por 30 segundos, seguido de imersão em hipoclorito de sódio (2,0% v/v) por 2 minutos, e três lavagens em água destilada autoclavada. Após a desinfestação, os grãos foram secos em câmara de fluxo por 12 horas e foram armazenados em saco de papel autoclavado até o momento da utilização.

Na montagem do ensaio, foram transferidos 45 grãos para a placa de Petri cultivada com cada um dos antagonistas e mais duas placas com apenas meio de cultura como testemunha absoluta e inoculada, agitando-se por 10 segundos, manualmente. Logo em seguida, os grãos foram transferidos para três placas de Petri 90 mm, restando 15 grãos em cada placa, com papel

filtro, formando três repetições para cada lote. Todas as placas eram armazenadas, por uma semana, em escuro, em local seco, a 28°C.

Ao completar o sétimo dia, era feita a inoculação do patógeno em todas as placas, menos na testemunha absoluta, por meio de suspensão 10^5 conídios/ml e 1 gota de tween 80, aspergiam-se 1,5 mL da suspensão sobre cada placa, o papel filtro ainda era umedecido com mais 2 mL de água destilada autoclavada e as placas eram fechadas com papel filme para evitar perda de umidade. O mesmo ensaio, em triplicata, foi realizado para *A. flavus* e *F. verticillioides*.

Os grãos foram avaliados, do 1º até o 7º dia, quanto à sua cobertura por micélio característico do fungo inoculado. Notas variando de 0-4 eram atribuídas ao grau de infecção, sendo 0 para ausência de micélio sobre a superfície do grão; 1 para 1% a 25%; 2 para 26% a 50%; 3 para 51% a 75% e 4 para 76% a 100% de grãos cobertos por estruturas do fungo potencialmente produtores de micotoxina. Foi calculado o índice de doença para cada avaliação e o valor médio de cada tratamento foi submetido à análise de variância. Para efeitos significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey ($p=0,05$).

3.4 Experimentos de Campo

3.4.1 Montagem e Manejo dos Experimentos de Campo

A determinação da eficácia da combinação biológico-químico em campo foi feita em quatro experimentos, dois em área experimental da Universidade Federal de Lavras, nas coordenadas geográficas -21.204242N, -44.980322W, chamada de Fazenda Vitorinha, em duas safras diferentes, uma na safra 2012/2013, com semeadura no dia 10/11/2012 e outra safra 2013/2014, com semeadura no dia 01/11/2013, na mesma área, seguindo a mesma ordem dos tratamentos. Outros dois experimentos iguais foram montados na safra 2012/2013, em área de parceiros, com semeadura no dia

20/12/2012, também na cidade de Lavras/MG, nas coordenadas geográficas 21.337645N e -45.126954W. A área foi chamada de porteira, por estar próxima à entrada da fazenda e a área situada em-21.337628N, -45.128748W foi chamada de central, por estar localizada no centro da fazenda. Todos os ensaios seguiram os tratamentos culturais descritos na Tabela 1, todos com inoculação artificial de *F. verticillioides*.

Tabela 1: Manejo comum nos experimentos de campo para todos os tratamentos

Manejo Experimento de Campo	
Atividades	Volumes
Plantio	90000 sementes/ha
Adubação de plantio	450 kg/ha de 8-28-16
Desbaste	Manter 60000 plantas/ha
Herbicida pós emergente 1º Aplicação	Soberan - 200 ml/ha + atrazina 2 L/ha
Adubação de cobertura	500 kg/ha de 20-00-20
Herbicida pós emergente 2º Aplicação	Soberan - 200 ml/ha + atrazina 2 L/ha

Os agentes de controle biológico foram selecionados com base nos dois melhores isolados para sanidade de grãos, obtidos nos experimentos anteriores, sendo um deles o *S.araujoniae* da Embrapa e o segundo, o *Bacillus* ssp, isolado pela metodologia de iscas citada nos experimentos de laboratório. Também foram utilizados tratamento com fungicida à base de triazol e estrubilurina, e 250 ml/ha do produto comercial (Priori Xtra) registrado para a cultura do milho (AGROFIT,2012).

Foram realizados nove tratamentos em que havia duas práticas comuns de manejo de doenças foliares utilizadas por agricultores, sendo uma com apenas uma aplicação de fungicida antes do início da fase reprodutiva da cultura e outro modelo com duas aplicações, uma antes da fase reprodutiva e outra no início da fase reprodutiva. Outro tratamento era a testemunha sem nenhum tratamento e, como o objetivo neste trabalho era inserir o biológico no manejo, os dois melhores biocontroladores do ensaio anterior foram colocados em combinação com o fungicida químico, em que um tratamento era biológico mais químico e outro era químico mais biológico em

aplicações distintas. Também foi realizado o tratamento no qual as duas aplicações foram de fungicidas biológicos, como demonstrado no Quadro 1. A primeira aplicação foi feita entre V9 e V10 e a segunda, em R1.

Quadro 1: Tratamentos feitos no campo

Tratamento	Aplicação 1	Aplicação 2
1	<i>Bacillus</i> ssp. BIOUFLA2	<i>Bacillus</i> ssp. BIOUFLA2
2	<i>S.araujoniae</i>	<i>S.araujoniae</i>
3	Priori Xtra	<i>Bacillus</i> ssp. BIOUFLA2
4	Priori Xtra	<i>S.araujoniae</i>
5	Priori Xtra	-
6	Priori Xtra	Priori Xtra
7	<i>Bacillus</i> ssp. BIOUFLA2	Priori Xtra
8		Priori Xtra
9	Testemunha	Testemunha

A produção dos antagonistas que foram utilizados no campo foi feita em meio líquido YPD, por 72 horas, em agitador orbital, a 150 rpm, à temperatura de 27°C. Depois, o fermentado era diluído a 50%, em água destilada esterilizada e adicionado óleo mineral 0,5%, para auxiliar no espalhamento durante a aplicação. Foi aplicado o volume equivalente a 200 L de calda por hectare, com aspersão por bomba de CO₂ e bico cone, de modo que a calda atingisse as inserções das espigas. Foi aplicado fungicida em concentração de 250 mL/ha, de acordo com recomendação (AGROFIT, 2012), utilizando 200 mL de volume de calda, com o mesmo modelo de equipamento para aplicação dos biocontroladores.

As aplicações foram feitas em dois estágios de desenvolvimento da planta, sendo a primeira entre V9-10 e a segunda, em início do florescimento (estádio R1).

A área selecionada tinha 40 linhas da cultura e 25 m de comprimento, em um talhão homogêneo. As parcelas totais eram compreendidas de quatro linhas espaçadas em 0,80 m x 5 m, com população de plantas final equivalente a 60.000 plantas/ha. A parcela útil, excluindo-se as bordas duras, eram as duas linhas centrais. Cada experimento foi montado em blocos casualizados, com quatro repetições para cada tratamento.

Para o ensaio de campo foi produzido inoculo de *F. verticillioides*. Como no experimento 3.2, foi feita uma suspensão 10^5 conídios/ml, contados em câmara de Neubauer. Quando a cultura atingiu 10 dias após a emissão do estilo estigma, foram aspergidos no estilo estigma 5 ml da suspensão do patógeno, seguindo protocolo sugerido por Mendes (2009).

3.4.2 Avaliações das Doenças no Campo

Logo após a segunda aplicação dos fungicidas, começaram as avaliações semanais, em que foram avaliadas doenças espontâneas (sem inoculação de patógeno). Elas foram feitas por cinco semanas, quando o milho já estava com enchimento de grãos completo.

Foram avaliadas cinco doenças que se mostraram presentes em avaliação visual, utilizando, como auxílio para identificação, o livro "Identificação e controle de Doenças na Cultura do Milho", da Embrapa. As doenças encontradas foram ferrugem-comum (*Pucciniasorghii*), cercospora (*Cercospora zea* - *maydis*), diplodia (*Stenocapella* sp.), antracnose (*Colletotrichum* sp.) e complexo mancha-branca (*Panteaananatis* e *Phaeospaeria maydis*). As avaliações foram feitas na primeira folha logo abaixo da espiga, utilizando notas variando de 0-4, que eram atribuídas ao grau de dano visível na folha, sendo 0 para ausência de sinais sobre a superfície da folha; 1 para 1% a 25%; 2 para 26% a 50%; 3 para 51% a 75% e 4 para 76% a 100%.

Os dados foram transformados e calculou-se a área abaixo da curva de progresso da doença por meio da equação (SHANER & FINNEY (1977))

$$AACPD = \sum [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [X_{i+1} - X_i],$$

em que Y_i = média de

doença (por unidade de tempo) na i - ésima observação; X_i = tempo em (dias) na i -ésima observação e n = número total de observações. Depois da transformação, os dados foram submetidos à análise de variância e, quando foram significativos a 5% de probabilidade, foram submetidos ao teste de separação de médias Scott-Knott. Cada experimento foi analisado separadamente, devido às diferentes condições a que foram submetidos em áreas e ano diferentes, sem controle do inóculo para doenças foliares e sem controle do clima, por ser experimento de campo e sofrer com as adversidades do ambiente.

3.4.3 Avaliação de Produtividade e Grãos Ardidos

As avaliações de maior importância foram realizadas com a colheita dos grãos de toda área útil das parcelas. A produtividade foi avaliada pela massa de grãos e a umidade foi medida ao mesmo tempo. Para submeter os dados de produtividade à análise, eles foram corrigidos à umidade padrão de 13%. Logo em seguida à pesagem, uma quantidade de grãos foi separada para fazer análise de grãos ardidos e outra parte para análise de blotter test.

Para análise de grãos ardidos foram contados 1.000 grãos e separados os ardidos, que foram contados e foram medidas a massa e a umidade dos grãos, contando-se separadamente sadios ardidos.

Com esses dados foram calculados massa de mil grãos, percentagem em número de grãos ardidos e percentagem em massa de grãos ardidos, todos sempre com a massa corrigida para 13% de umidade.

3.4.4 Avaliação de Sanidade dos Grãos

Para a montagem do blotter foram utilizados 200 grãos de cada parcela, distribuídos em cinco bandejas de isopor, com 40 grãos cada, sobre duas folhas de papel filtro autoclavadas e umedecidas com água destilada esterilizada e uma fina camada de ágar-água para manter a umidade. As bandejas foram levadas para sala de incubação, a 21°C e 12 horas de

fotoperíodo, por 24 horas, para embeber os grãos. Depois, foram colocadas em refrigerador tipo freezer, a -20°C, por 24 horas, para inibir a germinação, e, a seguir, colocadas novamente na sala de incubação, a 21°C e 12 horas de fotoperíodo, por 72 horas e, então, foram avaliadas. Foi averiguado se existia algum efeito residual dos tratamentos. Os dados de blotter test foram analisados em percentagem de grãos contaminados com *F. verticilioides*, pois, devido à inoculação artificial do patógeno no campo, o fungo era predominante nos grãos.

4 Resultados

4.1 Cepas Isoladas na Prospecção

Foram isoladas duas amostras coletadas em áreas diferentes, uma em Machado, MG e outra em Alfenas, MG, áreas com condições edafoclimáticas para o desenvolvimento de fungos causadores de grãos ardidos e onde eram realizados plantios diretos da cultura do milho pormais de dois anos consecutivos. Só foi observado crescimento de cepas de bactérias em iscas que foram colocadas em solos com a capacidade de campo de 50%, 75% e 100%. O plaqueamento mostrou crescimento de mais cepas isoladas na diluição 10^{-2} total, com 8 cepas diferentes de um total de 12 isoladas.

4.2 Pré-teste de Cepas Prospectadas

No pré-teste, apenas duas cepas foram capazes de criar algum alo de inibição. Foi um teste apenas qualitativo e serviu somente para reduzir o número de cepas que seriam trabalhadas na próxima etapa. As duas eram advindas da amostra de Alfenas, MG, na diluição 10^{-2} , porém, apresentavam características de coloração e crescimento bem distintas. Como tinham características das colônias morfológicas do gênero *Bacillus*, colocou-se suspensão destas bactérias, por 15 minutos, à temperatura de 80°C e, depois, foram plaqueadas para confirmar que eram do gênero

Bacillus que tem como característica a formação de endósporos que são resistentes a altas temperaturas, como mostradono trabalho de Wayne (2000). Também foi realizado teste de gram.

As duas cepas que foram utilizadas no teste seguinte receberam, então, o nome de *Bacillu ssp.* BIOUFLA2 e *Bacillu ssp.* BIOUFLA7.

4.3 Resultados da Seleção *in vitro*

Os resultados da seleção invitro mostraram que dois dos seis possíveis agentes de biocontrole tiveram resultados consistente com relação à redução da área colonizada nos grãos de canjica. O *Bacillu ssp.* BIOUFLA2 e o *S. araujoniae* mostraram redução da área infectada em relação à testemunha em todos os três experimentos, como mostradono gráfico das Figuras 1 e 2, para grãos inoculados com *A. flavus* e *F. verticilioides*, respectivamente. Pode ser observado, na Figura 3, como foi significativa a redução de área colonizada pelos fungos em relação à testemunha, no sétimo dia de avaliação, ao final do experimento.

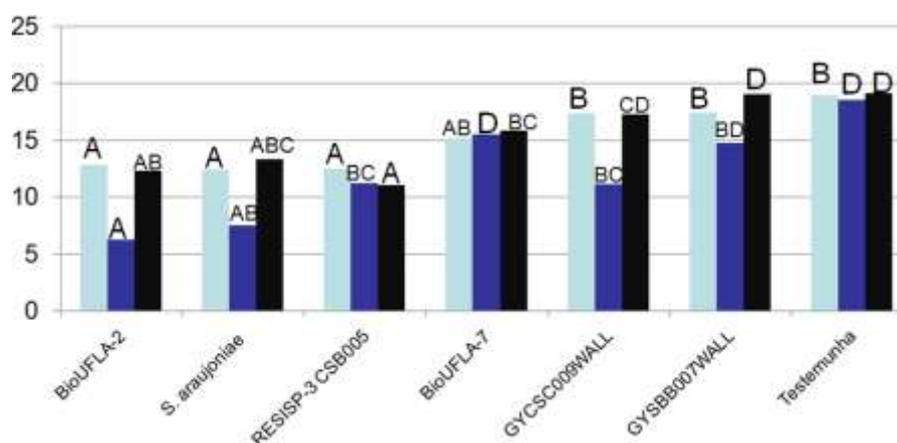


Figura 1: AACPD para *A. Flavus* em grãos de canjica tratados com bactérias. A separação por cores identifica experimentos diferentes. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância, para cada experimento.

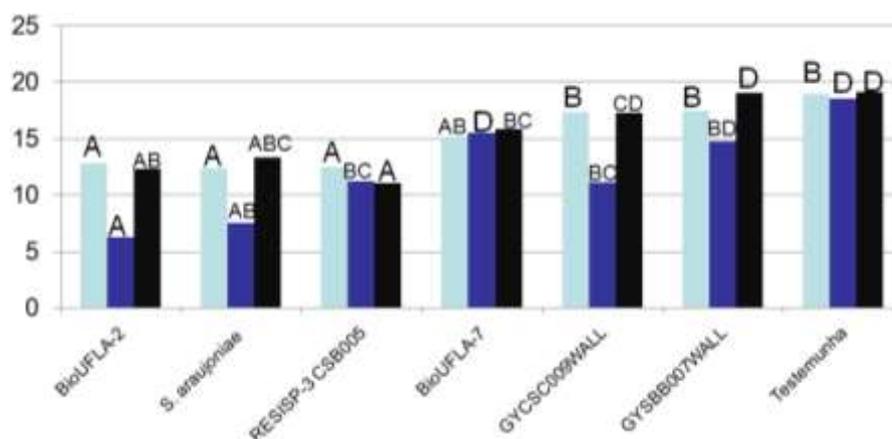


Figura 2: AACPD para *F. Verticillioides* em grãos de canjica tratados com bactérias. A separação por cores identifica experimentos diferentes. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de significância, dentro de cada experimento.

Como os resultados mostrados foram consistentes, sempre se mantendo entre os melhores tratamentos para os dois fungos causadores de grãos ardidos e potenciais produtores de micotoxinas nos testes *invitro*, os dois melhores tratamentos foram selecionados para serem testados no campo, dentro do manejo de doenças da cultura do milho. O objetivo era atingir um resultado, no que se refere aos grãos ardidos, em que o tratamento químico somente não vem se mostrando eficiente (LANZA, 2012), pois não tem um período residual grande e não apresenta bons resultados para o controle de doenças de grãos (MÜLLEN BORNET al., 2008), e não deve ser aplicado ao fim do ciclo, quando a cultura já entrou em fase de senescência. A fase de senescência, muitas das vezes, é quando os fungos causadores de grãos ardidos começam a atuar na produção das micotoxinas e infecção do grão (BUSH, 20004). Portanto, a utilização dos biocontroladores é uma opção para o manejo dos grãos ardidos e micotoxinas.

Os produtos químicos, além de não terem uma capacidade sistêmica igual de bactérias, (WHITE et al., 2014) e poderem atuar diretamente nos mesmos

sítios de infecção dos fungos patogênicos ao grão, com um efeito pós-colheita.

4.4 Resultados no Controle de Doenças no Campo

Foram analisados os dados das cinco doenças que se mostraram presentes. Cada experimento foi analisado separadamente. Nas tabelas a seguir mostram-se os resultados obtidos. O campo que se manteve mais sadio, com menos interferência de doenças não inoculadas, foi o dos experimentos montados na Fazenda Experimental da Universidade Federal de Lavras, nas duas safras.

A doença diplodia, apesar de presente, não mostrou resultado significativo com $p > 0,05$ em todos os ensaios.

Na safra 13/14, observa-se que as doenças foram muito menos presentes. Isto ocorreu por ser um ano de baixa pluviosidade em toda a região sudeste do Brasil, como mostram os dados de pluviosidade mensal do INMET, 2014, para região de Lavras/MG (**Tabela 2**).

Tabela 2: Dados de precipitação, em mm, do INMET, para a estação meteorológica de Lavras/MG, para safras 2011/2012, 2012/2013 e 2013/2014

Data	Safra 11/12	Safra 12/13	Safra 13/14
Setembro	0,6	17,10	64,40
Outubro	132,4	46,90	85,60
Novembro	172,8	152,70	180,40
Dezembro	441,2	140,40	162,70
Janeiro	529,2	499,97	219,70
Fevereiro	80,4	70,00	34,40
Março	133,1	170,60	77,90
Abril	38,8	55,50	123,40

Para as demais doenças, a distribuição foi diferente para cada um dos experimentos, pois os mesmos tiveram condições climáticas diferentes

(**Tabela 2**) devido à época de plantio. A fonte de inóculo, como foi natural sem controle para as doenças foliares, não teve um padrão. Porém, é notável o efeito do fungicida químico aplicado duas vezes para a grande maioria das doenças (**Tabelas 4, 5 e 6**). Porém, observa-se melhor ou o mesmo efeito quando a primeira aplicação foi substituída por um dos agentes de biocontrole, como explicado abaixo do gráfico de cada doença, exceto para ferrugem, que é um fungo biotrófico e existem poucos relatos do efeito da utilização de biocontroladores para seu controle.

Tratamento	Vit 13		Porteira		Central		Vit 14	
PRIORI XTRA + PRIORI XTRA	456,25	a	65,75	a	164,25	a	11,50	a
Streptomyces + PRIORI XTRA	622,00	a	74,00	a	97,50	a	7,50	a
PRIORI XTRA + Streptomyces	647,50	a	115,75	a	145,25	a	13,25	a
BIOUFLA2+BIOUFLA2	783,75	b	71,75	a	97,75	a	6,50	a
Streptomyces + Streptomyces	813,75	b	116,75	a	109,25	a	13,00	a
PRIORI XTRA	819,00	b	117,75	a	107,50	a	12,50	a
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	883,75	b	190,75	a	192,25	a	14,50	a
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	966,00	b	81,25	a	148,50	a	7,50	a
TESTEMUNHA	1014,50	b	190,75	a	45,70	a	11,00	a
CV	17,06%		62,89%		65,63%		59,69%	

Tabela 3: AACPD de antracnose em milho, em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra 12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit14 - Fazenda UFLA safra 13/14), com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, apenas no experimento VIT13. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

Antracnose (**Tabela 3**) foi a doença mais presente no experimento Vitorinha safra 12/13. Nos outros três experimentos, como houve um baixo nível de infestação, o coeficiente de variação ficou muito alto e não foram significativos os tratamentos, pois as notas, no momento das avaliações, raramente passavam de 1, o que compromete o uso da escala de notas.

Como era esperado, o experimento Vit13, com duas aplicações de fungicida, ficou entre os melhores, porém, não se distinguiu significativamente quando uma das aplicações foi substituída pelo *S. araujoniae*. A combinação com a primeira aplicação do biocontrolador foi mais estável em todos os quatro experimentos que, mesmo não obtendo diferenças significativas, tiveram valores muito baixos para a doença, comparados a outros tratamentos, mostrando um efeito consistente do controle. Outro fator importante é que teve correlação alta com a produtividade de -0,50. A antracnose pode provocar perdas da ordem de 18% (CARSON & HOOKER, 1981), 40% (SMITH, 1976) e 45% (COTA et al., 2012), o que demonstra o efeito direto de perdas de produtividade em relação ao aumento da quantidade da doença e deixa clara a importância que se deve ter com o manejo dessa enfermidade. Com os resultados obtidos pode-se recomendar, para esta doença, que a primeira aplicação de fungicida químico seja substituída por uma do biocontrolador testado *Streptomyces araujoniae*, quando ele estiver disponível comercialmente.

Tratamento	Vit13	Porteira	Central	Vit14
PRIORI XTRA + PRIORI XTRA	32,75 a	47,75 a	32,00 a	38,50 a
PRIORI XTRA	35,50 a	188,50 a	37,00 a	52,00 b
PRIORI XTRA + Streptomyces	30,50 a	126,00 a	76,00 a	39,50 a
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	39,50 a	160,50 a	89,75 a	43,75 a
Streptomyces + PRIORI XTRA	34,75 a	219,75 b	99,00 a	43,75 a
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	37,75 a	132,50 a	195,25 a	47,25 b
TESTEMUNHA	34,25 a	284,00 b	366,75 b	47,50 b
Streptomyces + Streptomyces	38,00 a	357,50 b	400,50 b	50,75 b
BIOUFLA2+BIOUFLA2	37,25 a	262,75 b	470,25 b	41,25 a
CV	13,55%	34,13%	62,49%	11,66%

Tabela 4: AACPD de ferrugemem milho em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit 14 - Fazenda UFLA safra 13/14) com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, em três experimentos, menos no experimento Vit13. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

A ferrugem (**Tabela 4**) foi uma doença de grande importância, em termos de área lesionada, nos experimentos montados no parceiro, juntamente com cercosporiose. Mas, apesar de uma AACPD menor no experimento Vit14, os tratamentos foram significativos. Já no experimento Vit13, praticamente não houve a presença da enfermidade na cultura, independente do tratamento, que ocorreu devido às diferenças do ambiente e ao não controle de inóculo. Os melhores resultados ocorreram quando a aplicação do fungicida químico foi feita antes do florescimento e, até mesmo quando houve apenas uma aplicação de fungicida químico, o resultado foi significativo. O resultado melhor na aplicação antes do florescimento já é observado em trabalhos como o de Juliatti (2004), no qual o melhor resultado foi aos 45 dias após a emergência, quando aparecem as primeiras pústulas. Isso demonstra que esses biocontroladores não têm efeitos diretos no controle da ferrugem comum do milho. Portanto, se as condições edafoclimáticas estão favoráveis ao patógeno dessa doença, não poderão ser substituídas aplicações do químico por nenhum dos biocontroladores testados.

Tratamento	Vit13	Porteira	Central	Vit14
Streptomyces + PRIORI XTRA	9,25 a	243,00 a	165,75 a	25,50 b
PRIORI XTRA + PRIORI XTRA	5,75 a	233,25 a	265,50 a	32,75 c
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	7,75 a	291,00 a	294,50 a	17,75 a
Streptomyces + Streptomyces	15,75 b	576,25 b	339,75 a	25,25 b
PRIORI XTRA + Streptomyces	8,25 a	413,75 b	375,75 a	30,25 c
PRIORI XTRA	10,50 b	412,50 b	449,75 b	35,00 c
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	8,50 a	409,50 b	471,50 b	26,50 b
BIOUFLA2+BIOUFLA2	15,00 b	542,75 b	522,50 b	35,25 c
TESTEMUNHA	14,00 b	582,50 b	523,75 b	33,25 c
CV	52,00%	23,51%	36,03%	17,83%

Tabela 5: AACPD de cercosporiose em milho, em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra 12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit 14 - Fazenda UFLA safra 13/14), com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, em todos experimentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

Cercospora (**Tabela 5**), doença que também acometeu a cultura de forma severa nos experimentos montados no parceiro, seguiu um padrão de controle próximo ao da antracnose, nos ensaios montados na fazenda da Universidade Federal de Lavras. A redução ocorreu quando a primeira aplicação foi feita com biocontrolador e a segunda com químico ou nas duas aplicações com químico. O interessante é que, nesse caso, o *Bacillus* sp. BIOUFLA2 também teve efeito sinérgico com o fungicida. A utilização de fungicidas químicos para esta enfermidade é comum, como já relatado em vários trabalhos, como os de Juliatti et al. (2002), Fantin et al. (2003) e Horst et al. (2003), demonstrando que o controle é efetivo, o que também aconteceu nos nossos experimentos. O diferente é a utilização dos biocontroladores na primeira aplicação, causando o mesmo efeito no controle da cercospora e se mantendo entre os melhores nos quatro experimentos.

Isto sugere que a redução de uma aplicação do produto químico é viável, principalmente quando os causadores das doenças são fungos necrotróficos, como no caso da antracnose e da cercospora.

Tratamento	Vit13	Porteira	Central	Vit14
Streptomyces + PRIORI XTRA	5,50 a	176,25 a	112,00 a	0,50 a
PRIORI XTRA + PRIORI XTRA	3,50 a	208,25 a	173,50 a	0,25 a
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	3,00 a	285,50 a	154,75 a	1,25 a
Streptomyces + Streptomyces	6,50 a	301,25 a	127,25 a	2,50 a
PRIORI XTRA + Streptomyces	2,75 a	317,75 a	169,75 a	0,75 a
PRIORI XTRA	2,50 a	332,50 a	112,50 a	0,25 a
TESTEMUNHA	4,50 a	416,75 b	127,25 a	2,00 a
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	1,25 a	458,50 b	71,25 a	2,50 a
BIOUFLA2+BIOUFLA2	4,00 a	483,50 b	77,75 a	0,75 a
CV	78,29%	30,69%	83,52%	165,69%

Tabela 6: AACPD de mancha-branca em milho, em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra 12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit 14 - Fazenda UFLA safra 13/14), com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, apenas no ensaio Porteira. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

O complexo mancha-branca (**Tabela 6**) praticamente não esteve presente nos experimentos montados na fazenda da Universidade Federal de Lavras e no experimento e na área chamada de Central, o que faz o coeficiente de variação ficar elevado e não apresentar resultado significativo. Já na área Porteira, em que houve um ataque maior da doença e controle, a primeira aplicação foi de fungicida químico ou com isolado *Streptomyces araujoniae*. Como actinomicetos podem produzir antibióticos (MATSUI et al., 2012) e o complexo mancha-branca tem como parte dos agentes etiológicos uma bactéria (BOMFETIET AL., 2003), uma hipótese é de que antibióticos produzidos pelo biocontrolador podem estar inibindo o crescimento do patógeno.

4.5 Resultados Pós-Colheita

4.5.1 Produtividade

A produtividade sofreu muita diferença entre ano e área da cultura. As diferenças ocorreram devido ao ciclo de chuvas que não foi suficiente na safra 12/13, tendo apenas a área da Vitorinha recebido a quantidade de chuvas na época correta. Já na safra 13/14 houve problemas de pluviosidade baixa em toda região sudeste (**Tabela 2**), incluindo a área do experimento Vitorinha. Outro problema que influenciou a produtividade foi o vento forte que acabou derrubando parte do experimento na fazenda do parceiro que teve uma produtividade maior. O interessante é que o resultado, entre os tratamentos, exceto experimento Porteira, todos obtiveram diferenças significativas de produtividade (**Tabela 7**).

Nos experimentos montados na área da Universidade Federal de Lavras que tiveram menos doenças foliares e não houve acamamento pelo vento forte, foi possível observar o efeito benéfico, em termos de produtividade do *S. araujoniae*, que ficou com as maiores produtividades de maneira consistente.

Já o isolado de *Bacillus* ssp não mostrou um incremento de produtividade constante nem mesmo nas áreas semelhantes.

Tratamento	Vit13	Porteira	Central	Vit 14
Testemunha	166,50 a	52,00 a	59,25 a	87,75 a
BIOUFLA2+BIOUFLA2	183,00 b	60,75 a	76,00 b	89,75 a
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	183,25 b	61,75 a	74,00 b	94,75 a
PRIORI XTRA	183,00 b	59,25 a	66,75 a	103,00 b
Streptomyces + PRIORI XTRA	199,75 c	69,00 a	63,50 a	105,25 b
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	182,50 b	58,50 a	57,00 a	108,75 b
PRIORI XTRA +PRIORI XTRA	192,25 c	67,25 a	60,00 a	109,25 b
PRIORI XTRA + Streptomyces	183,25 b	66,50 a	78,00 b	117,75 c
Streptomyces + Streptomyces	185,00 b	61,75 a	56,75 a	120,50 c
CV	3,32%	14,48%	14,28%	5,21%

Tabela 7: Tabela de produtividade em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra 12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit 14 - Fazenda UFLA safra 13/14) com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, em todos experimentos menos Porteira. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

Quando é feito o teste de correlação entre produtividade e as doenças foliares, comparando a correlação quantidade de grãos ardidos produtividade, é possível observar que a correlação de produtividade é forte em relação às doenças foliares e quase não tem correlação com peso de mil grãos ou percentagem de grãos ardidos.

Como o padrão de doenças não foi constante por serem ensaios sem inoculação dos patógenos foliares, a correlação foi mais forte para doenças diferentes em cada experimento, como, por exemplo, Vit13. A maior correlação de produtividade foi para antracnose, com valor próximo a -0,51. Já no experimento Vit14, a maior correlação foi com cercospora, -0,30. Isso mostra que o tratamento que melhor atuou nas doenças foliares é o melhor, em termos de incremento de produtividade.

Essa análise deixa claro que a produtividade está mais ligada às doenças foliares do que doenças do grão e espiga. Por isso foram importantes avaliações de doenças no campo, afinal o produtor sempre quer saber o resultado em produtividade.

4.5.2 Massa de mil grãos

A massa média de mil grãos não foi significativa em nenhum dos ensaios entre os tratamentos, mas teve diferença nas médias entre os experimentos. Na Vitorinha safra 12/13, a média foi 347g; na Vitorinha safra 13/14, foi de 342 g; na Porteira, 347 g e na área Central, foi de 327 g.

4.5.3 Percentagem de grãos ardidos

A quantidade de grãos ardidos foi significativa em todos os ensaios, como mostrado na **Tabela 8**, que se refere à percentagem em massa de grãos ardidos nos experimentos. É interessante observar que a área Central na fazenda do parceiro teve um padrão diferente de resultados, cujos motivos são explicados mais à frente.

Tratamento	Vit 2012/2013	Porteira	Central	Vit 2013/2014
Streptomyces + PRIORI XTRA	6,10 a	8,00 a	17,75 a	6,25 a
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	6,68 a	9,75 b	23,75 b	8,50 a
PRIORI XTRA + Streptomyces	7,35 a	8,00 a	26,25 b	8,75 a
Streptomyces + Streptomyces	7,91 a	6,75 a	19,75 a	9,00 a
PRIORI XTRA	5,43 a	8,25 a	23,00 b	9,00 a
PRIORI XTRA + PRIORI XTRA	9,66 b	8,75 a	16,25 a	17,00 b
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	9,67 b	10,25 b	14,25 a	11,50 b
BIOUFLA2+BIOUFLA2	10,50 b	8,75 a	22,25 b	12,75 b
TESTEMUNHA	11,81 b	11,5 b	24,00 b	13,00 b
CV	22,82%	18,24%	23,41%	35,10%

Tabela 8: Percentagem de grãos ardidos em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra 12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit 14 - Fazenda UFLA safra 13/14) com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, em todos experimentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

Com respeito aos grãos ardidos, é muito interessante observar que, em todos os ensaios, uma aplicação do isolado de *S. araujoniae* mais uma de fungicida ou duas aplicações do isolado sempre ficaram entre os tratamentos com menor número de grãos ardidos, nos testes de separação de médias.

Portanto, fica claro o efeito desse potencial biocontrolador, visando à redução de grãos ardidos por *F. verticillioides* com aplicação no campo, até mesmo substituindo aplicações de químicos por produtos biológicos.

O padrão diferente de resultados apenas na área central ocorreu, pois houve um fator externo forte. Uma grande quantidade de inóculo não planejado de *Stenocarpella maydis*, na área que circundava o experimento, apresentou uma quantidade de grãos ardidos média próxima a 60%, o que pode ter interferido nos resultados. Uma das características desse patógeno é a redução do peso dos grãos, que pode ser observada no peso de mil grãos e que foi o menor dentre as 4 áreas.

4.5.4 Resultado de análise de blotter teste

Com a análise de blotter teste foi possível observar que o método de inoculação de *F. verticillioides* foi efetivo, em todos os ensaios, a predominância do fungo. Como as condições da incubação do blotter eram ótimas para o crescimento do fungo inoculado e ele tem um crescimento rápido, praticamente não foi possível observar outra espécie de fungo nos grãos, pois a avaliação tinha que ser feita logo antes que o fungo tomasse a placa, mascarando o resultado. Por isso foram avaliados apenas grãos com *F. verticillioides*.

Como se observa na **Tabela 9**, todos os experimentos tiveram resultados significativos, com $p < 0,05$.

O resultado do blotter teste mostrou que o fungicida químico não tem efeito no pós-colheita para o controle do fungo inoculado, pois, quando o tratamento foi o de duas aplicações de Priorixtra, os resultados ficaram muito próximos.

Tratamento	Vit13		Porteira		Central		Vit14	
PRIORI XTRA + Streptomyces	50,25	a	49,25	a	57,75	a	46,75	b
Streptomyces + PRIORI XTRA	50,75	a	42,75	a	65,00	a	39,50	a
PRIORI XTRA	54,25	a	52,25	b	66,50	a	51,75	b
BIOUFLA2+BIOUFLA2	54,25	a	43,75	a	79,25	c	37,75	a
Streptomyces + Streptomyces	56,00	a	47,00	a	65,75	a	43,00	a
BIOUFLA2 + PRIORI XTRA	57,00	a	52,00	b	71,50	b	47,50	b
PRIORI XTRA + BIOUFLA2	57,00	a	43,25	a	73,50	b	38,00	a
PRIORI XTRA + PRIORI XTRA	58,50	a	58,75	b	71,75	b	49,00	b
TESTEMUNHA	73,75	c	56,75	b	85,00	c	48,50	b
CV	10,43%		13,14%		8,89%		14,65%	

Figura 9: Percentagem de grãos com *Fusarium verticillioides* em 4 experimentos (Vit13 - fazenda UFLA safra 12/13; Porteira - Fazenda de parceiros safra 12/13; Central - fazenda de parceiro safra 12/13; Vit 14 - Fazenda UFLA safra 13/14) com diferentes tratamentos, incluindo agentes de controle biológico no manejo, com $p < 0,05$, em todos os experimentos. As médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si, a 5% de significância, pelo teste de Scott-Knott, dentro de cada experimento.

Isso é muito interessante, pois os grãos após a colheita, dependendo das condições de armazenamento, podem entrar em processo de decomposição e os fungos podem começar e/ou continuar produzindo micotoxinas no grão, como já mostrava Bacon (2001).

Com os resultados fica comprovado que o uso de agentes de controle biológico pode continuar o efeito em pós-colheita, diferente dos fungicidas químicos.

5 Considerações Finais

O uso do actinomiceto *Streptomyces araujoniae* no manejo da cultura do milho demonstrou ótimos resultados, tanto para doenças foliares, antracnose, cercosporiose e mancha-branca, como foi efetivo no que diz respeito à redução de grãos ardidos. Obtiveram-se resultados consistentes nos quatro experimentos montados. É uma tecnologia que merece ser desenvolvida para que se torne um produto para a agricultura brasileira que deve respeitar normas rígidas, no que tange ao nível de micotoxinas, em um país tropical com clima considerado ótimo para o desenvolvimento desses fungos micotoxigênicos, como o caso do *F. verticillioides*.

Outro fator importante é o fator sinérgico com a utilização do actinomiceto e o fungicida químico, que pode facilitar as práticas de manejo e reduzir custos com aplicações, sem alterar de forma drástica o que o produtor já está acostumado a fazer.

O agente de controle biológico tem efeito em pós-colheita, o que quase não é notado quando se utiliza apenas o controle químico adotado.

Apesar de apresentar algum efeito, o *Bacillus* spp utilizado não demonstrou um resultado consistente quando se observam os quatro ensaios, tanto para doenças foliares quanto para grãos ardidos, mas é uma opção que requer mais estudos para se saber como atingir o máximo do potencial igual ao teste *in vitro*. E, como os dados de produtividade também não foram os melhores com a utilização do *Bacillus* spp, não será fácil encaixar no manejo o agricultor que sempre almeja patamares maiores de produtividade.

6 REFERÊNCIAS

BATISTA, L. R. Espécies de *Aspergillus* e *Penicillus* produtoras de micotoxinas e importância para alimentos e bebidas. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, p. 51-53, ago. 2010. Suplemento.

BEEVER, R. E.; BOLLARD, E.G. The nature of the stimulation of fungal growth by potato extract. **Journal of General Microbiology**, London, v. 60, p. 273-279, 1970.

BHAT, R. V. Human health problems associated with current agricultural food production. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, Victoria, v. 17, n. 1, p. 91-94, 2008. Supplement.

BOMFETI, C.A. et al. Avaliação de produtos químicos comerciais, in vitro e in vivo, no controle da doença foliar, mancha branca do milho, causada por *Pantoeaananatis*. **Summa phytopathologica**, Jaguariúna, v.33, n. 1, p. 63-67, jan./mar. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 7**, de 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre limites máximos tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.abitrigo.com.br/pdf_legislacao/RESOLUCAO-RDC_N_7_DE_18-02-2011-09.03.201_%20p66_%20e_67.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/ap_produto_form_detalhe_cons?p_id_produto_formulado_tecnico=10094>. Acesso em: 23 out. 2012.

BRODERS, K. D. et al. Characterization of *Pythium* spp. associated with corn and soybean seed and seedling disease in Ohio. **Plant Disease**, Quebec, v. 91, n. 6, p. 727-735, 2007.

BUSH, B. J. et al. Payne infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 94, n. 1, p. 88-93, 2004.

CAMARGOS, S. M. et al. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v.109, n.2, p.325-332, 2001.

CARSON, M.L.; HOOKER, A.L. Inheritance of resistance to stalk rot of corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 71, p. 1190-1196, 1981.

CAST REPORT. **Mycotoxins**: risks in plant, animal, and human systems. Ames: Iowa State University, 2003. 199 p.

CAVAGLIERI, L. et al. In vitro influence of bacterial mixtures on *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B-1 production: effect of seeds treatment on maize root colonization. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 390-396, 2005.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento de safra brasileira**: grãos, décimo segundo levantamento, setembro 2012. Brasília, 2012. 30 p.

CORONEL, M. B. et al. Review Ochratoxin A: presence in human plasma and intake estimation. **Food Science and Technology International**, London, v. 16, n. 1, p. 5-18, 2010.

COSTA, R. V. et al. **Sistemas de produção**. 5. ed. Sete Lagoas: EMBRAPA Milho e Sorgo, 2009. Disponível em: <<http://www.cnpms.embrapa.br/publicacoes/publonline.php>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

COTA, L. V. et al. Quantification of yield losses due to anthracnose stalk rot on corn in Brazilian conditions. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 160, n. 11/12, p. 680-684, Dec. 2012.

DORNER, J. W. Biological control of aflatoxin contamination in corn using a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus*. **Journal of Food Protection**, Guildford, v. 72, n. 4, p. 801-804, 2009.

DOUMBOU, C.L. et al. Actinomycetes, promising tools to control plant diseases and to promote plant growth. **Phytoprotection**, Saint Hyacinthe, v. 82, n. 3, p. 85-102, 2001.

EHRlich, K. C.; COTTY, P. J. An isolate of *Aspergillus flavus* used to reduce aflatoxin contamination in cottonseed has a defective polyketide synthase gene. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 65, n. 4, p. 473-478, 2004.

FANTIN, G. M.; DUARTE, A. P.; PINTO, R. A. Controle da cercosporiose do milho na safrinha. **Summa Phytopathologica**, Jaboticabal, v. 29, n. 1, p. 90-92, 2003.

FRAVEL, D.R. Commercialization and implementation of biocontrol. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.43, p.337-359, July 2005.

GHINI, R.; KIMATI, H. **Método de iscas para obtenção de isolados de Trichoderma antagônicos a Botrytis cinera**. Jaguariuna: EMBRAPA-CNPDA, 1989. 13 p. (Boletim de Pesquisa, 3).

GIORNI, P. et al. Effect of a(w) and CO₂ level on *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production in high moist-Lire maize post-harvest. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 1/2, p. 109-113, 2008.

GORYACHEVA, I. Y. et al. Determination of Ochratoxin A in colored food products: Sample preparation and an immunoassay test method. **Journal of Analytical Chemistry**, New York, v. 65, n. 7, p. 760-766, 2010.

HORST, G.C. et al. Eficácia do controle químico de doenças foliares do milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. S309, 2003. Suplemento.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. **Banco de dados meteorológicos para ensino e pesquisa**. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>. Acesso em: 30 ago. 2014.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 342-362, 2007.

JULIATTI, F. C. et al. Controle da feosféria, ferrugem comum e cercosporiose pelo uso da resistência genética, fungicidas e épocas de aplicação na cultura do milho. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 20, n.3, p. 45-54, 2004.

JULIATTI, F. C. et al. Manejo integrado de cercosporiose em milho e viabilidade econômica do uso de fungicidas no cerrado brasileiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, p. S121, 2002. Suplemento.

LABORATÓRIO DE ANÁLISE DE MICOTOXINAS. **Estatísticas: contaminação por fumonisina B1 e B2 no milho e ração**. Disponível em: <http://www.lamic.ufsm.br/web/?q=resultados_fumonisinias>. Acesso em: 31 ago. 2013.

LANZA, F. E. et al. Eficiência do controle químico na redução da incidência de grãos ardidos em milho. In: CONGRESSO NACIONAL DE MILHO E SORGO, 29., 2012, Sete Lagoas. **Anais...Sete Lagoas**: EMBRAPA, 2012. p.657-664.

LEIFERT, C. et al. Antibiotic production and biocontrol activity by bacillus-subtilis CL27 and Bacillus-Pumilus CL45. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v.78, n.2, p.97-108, 1995.

MATSUI, T.T.J.; NAMIHIRA, T.; SHINZATO, N. Antibiotics production by an actinomycete isolated from the termite gut. **Journal of Basic Microbiology**, Malden, v. 52, n. 6, p. 731-735, Dec. 2012.

MEDEIROS, F. H. V. et al. Biological control of mycotoxin-producing molds. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.6, n.5, p.483-497, set./out. 2012.

MEGAN, N. et al. Post-harvest fungal ecology: impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.109, p. 723-730, Sept. 2003.

MENDES, M. C. **Micotoxinas, aspectos químicos e bioquímicos relacionados a grãos ardidos em híbridos de milho**. 2009. 106 p. Tese (Doutorado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MENDES, M. C. et al. Comportamento de híbridos de milho inoculados com os fungos causadores do complexo grãos ardidos e associação com parâmetros químicos e bioquímicos. **Ambiência**, Guarapuava, v. 8, n. 2, p. 275-292, maio/ago. 2012.

MILICEVIC, D. R. et al. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. **Toxins**, New York, v. 2, n. 4, p. 572-592, Apr. 2010.

MULLENBORN, C. et al. Effect of fungicides on the complex of Fusarium species and saprophytic fungi colonizing wheat kernels. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 120, n. 2, p. 157-166, 2008.

PEREIRA, O. A. P. et al. Doenças do milho (Zeamays). In: KIMATI, H. et al. (Ed.). **Manual de fitopatologia**. 4.ed. São Paulo: Ceres, 2005. v. 2, p. 333-349.

PEREIRA, P. et al. Impact of bacterial biological control agents on fumonisin B-1 content and Fusarium verticillioides infection of field-grown maize. **Biological Control**, Orlando, v. 53, n. 3, p. 258-266, June 2010.

PEREIRA, P.; NESCI, A.; ETCHEVERRY, M. Effects of biocontrol agents on Fusarium verticillioides count and fumonisin content in the maize agroecosystem: impact on rhizospheric bacterial and fungal groups. **Biological Control**, Orlando, v. 42, n. 3, p. 281-287, 2007.

PINAZZA, A. H. **Consórcio de plantas economicamente exploráveis (*Saccharum officinarum*/*Zeamays*) para maior estabilidade do agroecossistema**. 1993. 137 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, Araras, 1993.

PINTO, N. F. J. **Grãos ardidos em milho**. Sete Lagoas: EMBRAPA, 2005. 6 p.

PITT, J. I. Toxigenic fungi and mycotoxins. *British Medical Bulletin*, London, v. 56, n. 1, p. 184-192, 2000.

REIS, E.M. et al. **Manual de diagnose e controle de doenças do milho**. 2. ed. Lages: Graphel, 2004. 141 p.

ROMERO, S. M. et al. Ochratoxin A production by a mixed inoculum of *Aspergillus carbonarius* at different conditions of water activity and temperature. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 140, n. 2/3, p. 277-281, 2010.

SANTÚRIO, J.M. Minimizando perdas e/ou uso de ingredientes não contaminados por micotoxinas. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE AVICULTURA, 18., 2003, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: UFSM, 2003. 1 CD ROM.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow- mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v.67, n.8, p.1051-1056, 1977.

SHARMA, R. R. et al. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: a review. **Biological Control**, Orlando, v. 50, n. 3, p. 205-221, 2009.

SILO-SUH, L. A. et al. Biological activities of two Fungistatic Antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.60, n.6, p.2023-2030, 1994.

SMITH, D.R. Yield reduction in dent corn caused by *Colletotrichum graminicola*. **Plant Disease Reporter**, Washington, v. 60, p. 967-970, 1976.

SWARTZ, E.; MARCHIORO, V. S. Controle de doenças com fungicida em milho safrinha. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v. 2, n.1, p. 38-45, 2009.

SYNGENTA CROP PROTECTION. **Afla-Guard GR label**. Disponível em: <http://www.syngentacropprotection.com/Labels/p-1130/Afla-Guard_GR>. Acesso em: 29 out. 2012.

TSITSIGIANNIS, D. I. et al. Biological control strategies of mycotoxigenic fungi and associated mycotoxins in Mediterranean crops. **Phytopathologia Mediterranea**, Bologna, v. 51, n. 2, p. 158-174, 2012.

WAYNE, L. N. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extra terrestrial environments. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 64, p. 548-572, Sept. 2000.

WHITE, J. F. et al. Microscopy research and technique: occurrence of *Bacillus amyloliquefaciens* as a systemic endophyte of vanilla orchids. **Microscopy Research and Technique**, New York, 2014. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/264247980_Microscopy_research_and_technique_Occurrence_of_Bacillus_amyloliquefaciens_as_a_systemic_endophyte_of_vanilla_orchids>. Acesso em: 10 nov. 2014.

YAN, P. S. et al. Cyclo (L-leucyl-L-prolyl) produced by *Achromobacter xylosoxidans* inhibits aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 70, n. 12, p. 7466-7473, 2004.

YAZAR, S.; OMURTAG, G. Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 11, p. 2062-2090, 2008.

YU, H. et al. Isolation of deoxynivalenol-transforming bacteria from the chicken intestines using the approach of PCR-DGGE guided microbial selection. **BMC Microbiology**, London, v. 10, n. 182, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/182>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

ZUCCHI, T. D. et al. *Streptomyces* sp ASBV-1 reduces aflatoxin accumulation by *Aspergillus parasiticus* in peanut grains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 105, n. 6, p. 2153-2160, 2008.

ZUCCHI, T. D.; MELO, I. S. **Controle biológico de fungos aflatoxigênicos**: biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2009. 341 p.