

Atividade antagonista in vitro de *Bacillus subtilis* contra fungos fitopatogênicos do milho e sorgo

José E. F. Figueiredo^{1,2}, Marta A. Teixeira³, Guilherme V. C. Lima³, Wellington Bressan¹, Nicésio F. J. Pinto¹ e Carlos R. Casela¹

¹Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, CP 151, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

²Autor para correspondência – jeff@cnpms.embrapa.br

³UNIFEMM, Centro Universitário de Sete Lagoas, 35701-970, Sete Lagoas, MG.

Palavras-chave: bactéria endofítica, fungos fitopatogênicos, milho, sorgo.

Introdução

Os fungos são os principais microrganismos transmitidos via semente na cultura do milho, podendo provocar problemas de germinação, de emergência de plântulas e podridões radiculares e da base do colmo (SHURTLEFF, 1992).

Dentre os fungos patogênicos transmitidos pelas sementes de milho, destacam-se *Fusarium moniliforme* [sin. *F. verticillioides* (Sacc.) Nirenberg], *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wils., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* sp. O fungo *F. moniliforme* também está associado ao apodrecimento de sementes de milho e à morte de plântulas em pré ou pós-emergência (TRENTO et al., 2002). No Brasil, *Fusarium moniliforme* é o principal patógeno associado a sementes de milho (REIS; CASA, 1996), seguido por *Aspergillus* spp e *Penicillium* spp, que são encontrados com maior frequência em sementes armazenadas (CASA et al., 2006).

O fungo *Aspergillus niger* Tiegh, é saprofita cosmopolita e causa problemas apenas na degradação de órgãos vegetais armazenados. Em sementes, é prejudicial quando lotes são armazenados com umidade elevada. Diversas espécies de *Aspergillus* podem ocorrer em um mesmo lote de sementes e constituem um grupo de microrganismos de difícil identificação e por isso são computados como *Aspergillus* spp (PIEROBOM; DEL PONTE, 2010). Algumas espécies de *Aspergillus* são produtoras de micotoxinas com elevado poder cancerígeno, inviabilizando a utilização dos grãos como alimento (PIEROBOM; DEL PONTE, 2010; PINTO, 2001).

O fungo *Acremonium strictum* W. Gams (sin. *Cephalosporium acremonium* Auct. non Corda), causador de podridão de sementes, morte de plântulas e podridão de colmos, interfere diretamente no estande, vigor e produtividade das plantas, com perdas consideráveis à cultura do milho (TEIXEIRA et al., 2005). Embora o fungo já esteja bem estabelecido nas diversas regiões produtoras, pouco se conhece, em termos numéricos, sobre os prejuízos causados por *A. strictum* à cultura de milho no Brasil (PINTO, 2001; PINTO et al., 1997). Em diversos países, a ocorrência de *A. strictum* causa danos significativos em área de cultivo e em sementes de milho armazenadas (DUNGAN; KOEHLER, 1944; FISHER et al., 1992).

A antracnose do sorgo é a principal e mais devastadora doença que ameaça a produção dessa cultura no Brasil. Ela reduz a produção no campo e é favorecida por condições de umidade e temperaturas altas, podendo provocar perdas severas, mesmo em regiões com breves períodos de chuva, seguidos de seca prolongada. A doença tem *C. sublineolum* como agente etiológico. Este fungo infecta todas as partes da planta, porém, a fase foliar da doença é a mais importante, por reduzir a produção de grãos e de forragem em 50% ou mais, dependendo da severidade da epidemia (CASELA et al., 1992; NIETSCHKE et al., 2001).

A helmintosporiose (*Exserohilum turcicum*) ocorre em todas as áreas úmidas onde o sorgo é cultivado. A doença se estabelece em cultivares suscetíveis antes da emergência da panícula, levando a perdas na produção acima de 50%. No Brasil, essa doença ocorre principalmente em plantios de milho safrinha, pois condições de temperatura moderada (18-27 °C), associadas à alta umidade relativa, favorecem o desenvolvimento da doença (CASELA et al., 1997).



Diferentes linhagens de bactérias endofíticas, pertencentes a diferentes filos do domínio Bactéria, apresentam atividade antagonista contra diferentes organismos fitopatogênicos e por isso representam importante e inexplorada fonte de agentes para biocontrole e manejo integrado de doenças e pragas agrícolas (ANGONESE et al., 2009; ASSUMPÇÃO et al., 2009; BENHAMOU et al., 2000; BERG et al., 2005; CAZORLA et al., 2007; INIGUEZ et al., 2005; KLOEPPER et al., 1989; LIU et al., 2007; SCHULZ; BOYLE, 2005; SESSITSCH et al., 2004; STURZ; NOWAK, 2000; STURZ et al., 1999; ZINNIEL et al., 2002).

Várias espécies de *Bacillus* são antagonistas de fungos fitopatogênicos podendo ser usadas em programas de controle biológico (ANGONESE et al., 2009; SCHISLER et al., 2004; WILHELM et al., 1998, WULFF et al., 2002). Bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico, pois mantêm sua viabilidade quando estocadas por longos períodos (PETRAS; CASIDA, 1985).

A bactéria endofítica *Bacillus subtilis* foi capaz de reduzir os níveis de micotoxinas acumuladas nas sementes de milho por *Fusarium moniliforme* (BACON et al., 2001). Isolados de *Bacillus* spp. inibiram o crescimento de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos (*Citrus* spp.), tanto sob condições de laboratório como nas condições de campo (KUPPER et al., 2003). Em batata-doce (*Beta vulgaris* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.), a aplicação de *B. subtilis* reduziu a incidência de *R. solani*, *Pythium* sp. e outros patógenos, além de estimular a germinação, o crescimento e a produtividade das plantas (BALDOTTO et al., 2010; RAUPACH; KLOEPPER, 1998). *B. subtilis* apresenta atividade in vitro contra diferentes tipos de patógenos para várias espécies cultivadas, por meio da produção de antibióticos como iturina A e surfactina, capazes de inibir o crescimento micelial de fungos (ASAKA; SHODA, 1996). Do mesmo modo, *Bacillus cereus* isolado de *Sinapis* excreta quitinase e sua aplicação no solo protegeu de forma significativa plântulas de algodão contra doenças causadas por *Rhizoctonia solani* (PLEBAN et al., 1997).

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antagonista do isolado CNPMS-22, de *Bacillus subtilis*, contra os principais fungos fitopatogênicos das culturas do milho e do sorgo, visando seu emprego para controle de doenças fúngicas em plantas.

Material e Métodos

No presente estudo, a atividade antagonista do isolado de bactéria endofítica CNPMS-22 foi testada contra os principais fungos patogênicos das culturas do milho e do sorgo. A bactéria CNPMS-22 foi previamente isolada da variedade de milho-doce CMS-61 e identificada por meio de sequenciamento parcial do gene 16S rRNA e da região intergênica 16S-23S como pertencente à espécie *Bacillus subtilis* (FIGUEIREDO et al., 2009). Para estudar o efeito fungistático de CNPMS-22 sobre o crescimento micelial dos isolados fúngicos, utilizou-se a técnica de cultivo pareado em placa de Petri contendo LB (BERTANI, 1951) e BDA (KADO; HESKETT, 1970), a inoculação conjunta e a implantação de discos de cultura fúngica sobre culturas do antagonista.

Foram realizados três ensaios para avaliar a atividade antagonista de CNPMS-22:

Experimento 1: 500 µL de cultura da bactéria CNPMS-22 foi plaqueada por espalhamento em meio LB e BDA semi-sólido, incubada por 12 h a 28 °C para crescimento. Em seguida, discos contendo meio de cultura com colônias de cada fungo fitopatogênico, medindo aproximadamente 2 cm de diâmetro, foram colocados no centro das placas de cultura da bactéria CNPMS-22 e incubados por 7-30 dias à temperatura de 28 °C.

Experimento 2: Placas contendo meio LB e BDA semi-sólido foram divididas ao meio por marca de caneta e cada isolado fúngico foi inoculado em uma das metades. Após 7 e 15 dias de incubação à temperatura de 28 °C, a bactéria CNPMS-22 foi estriada no lado oposto da placa contendo a cultura do fungo e novamente incubada por 7 a 30 dias.

Experimento 3: 100 µL de cultura da bactéria CNPMS-22 e fragmentos de aproximadamente 3 cm de cultura de cada um dos seis fungos testados foram misturados por agitação em vortex, inoculados em



placas contendo meio LB e BDA semi-sólido e incubados por 7 a 30 dias a 28 °C. Placas contendo apenas inóculos de fungos foram empregados como testemunhas.

A avaliação do antagonismo ocorreu durante um período de 30 dias, medindo-se o comprimento da cultura fúngica antes e após a inoculação. Empregou-se um delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, considerando-se cada placa como uma parcela experimental.

Resultados e Discussão

O isolado CNPMS-22 foi testado para a presença de atividade antagonista contra seis fungos fitopatogênicos (*Fusarium moniliforme*, *Exserohilum turcicum*, *Acremonium strictum* e *Colletotrichum sublineolum*), causadores de doenças nas culturas do milho e do sorgo. O isolado de *Bacillus subtilis* CNPMS-22 impediu o crescimento de todas as seis espécies de fungos fitopatogênicos testados. (Figura 1). Não foram observadas variações significativas nos resultados entre os três experimentos (inoculação de fragmentos de cultura fúngica em cultura estabelecida da bactéria CNPMS-22; inoculação da bactéria após o estabelecimento da cultura do fungo em uma das metades de placa contendo LB ou BDA e inoculação conjunta bactéria CNPMS-22 + fungo). Também não foram observadas variações significativas dos resultados dentro do mesmo experimento ou em diferentes meios de cultura (LB ou BDA). Em todos os ensaios, a bactéria CNPMS-22 provocou a parada do crescimento das seis espécies de fungos com uma atividade avaliada em 100% de inibição.

Resultados semelhantes ao que está sendo relatado no presente estudo foram descritos por outros grupos de estudo que empregaram metodologia similar para avaliar a atividade fungistática de *Bacillus* spp. e *B. subtilis* contra fungos causadores de doenças em plantas (ANGONESE et al., 2009; ASAKA; SHODA, 1996; FERREIRA et al., 1991; KALITA et al., 1996; KUPPER et al., 2003; PUSEY; WILSON, 1984; PUSEY et al., 1986; SONODA; GUO, 1996). Em conjunto, esses estudos demonstraram que bactérias do gênero *Bacillus* possuem grande potencial para serem usadas como agentes de controle biológico de fungos fitopatogênicos. Diferentemente do que ocorre com outros grupos de bactérias, espécies de *Bacillus* mantêm sua atividade fungistática mesmo após longos períodos de armazenamento (PETRAS; CASIDA, 1985). De fato, a bactéria CNPMS-22, isolada em 2005, tem demonstrado nesse período atividade anti-fúngica semelhante em todos os experimentos em que tem sido utilizada com essa finalidade.

Conclusão

O isolado bacteriano endofítico CNPMS-22 apresenta atividade antagonista contra diferentes espécies de fungos fitopatogênicos, em diferentes formas de inóculo, e poderá representar importante alternativa para o controle biológico e manejo integrado de doenças fúngicas nas culturas do milho e do sorgo.

Referências

ANGONESE, M. T.; DELLA-GIUSTINA, J.; PAIM, L. H.; PANSERA, M. R.; PAGNO, R. S.; MEZZOMO, F.; ZORZI, E.; PEREIRA, C. O. F.; RIBEIRO, R. T. S. Fungistatic effect of *Bacillus* spp on plant pathogenic fungi. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 4, n. 2, p. 97-100, 2009.

ASAKA, O.; SHODA, M. Biocontrol of *Rhizoctonia solani* damping-off of tomato with *Bacillus subtilis* RB14. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 4081-4085, 1996.

ASSUMPTÇÃO, L. C.; LACAVALA, P. T.; DIAS, A. C. F.; AZEVEDO, J. L.; MENTEN, J. O. M. Diversidade e potencial biotecnológico da comunidade bacteriana endofítica de sementes de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 5, p. 503-510, 2009.



BACON, C. W.; YATES, I. E.; HINTON D. M.; MEREDITH, F. Biological control of *Fusarium moniliforme* in maize. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, p. 325-332, 2001. Suplemento 2.

BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; OLIVARES, F. L.; VIANA, A. P.; BRESSAN-SMITH, R. Seleção de bactérias promotoras de crescimento no abacaxizeiro cultivar Vitória durante a aclimatização. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, v. 34, n. 2, p. 349-360, 2010.

BENHAMOU, N.; GAGNE, S.; LE QUERE, D.; DEHBI, L. Bacterial-mediated induced resistance in cucumber: beneficial effect of the endophytic bacterium *Serratia plymuthica* on the protection against infection by *Pythium ultimum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 90, p. 45-56, 2000.

BERG, G.; KRECHEL, A.; DITZ, M.; SIKORA, R. A.; ULRICH, A.; HALLMANN, J. Endophytic and ectophytic potato-associated bacterial communities differ in structure and antagonistic function against plant pathogenic fungi. **FEMS Microbiol Ecology**, Amsterdam, v. 51, n. 2, p. 215-229, 2005.

BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 62, p. 293-300, 1951.

CASA, R. T.; REIS, E. M.; NERBASS, F. R. Implicações epidemiológicas da transmissão de fungos em sementes de milho. In: SIMPÓSIO DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS, 6., 2006, Lavras. **Manejo integrado de doenças de grandes culturas: feijão, batata, milho e sorgo**. Lavras: UFLA: DFP: NEFIT, 2006. p. 202-212.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; SCHAFFERT, R. E. Physiological races of *Coletotrichum graminicola* in Brazil. In: MILLIANO, W. A. J.; FREDERIKSEN, R. A.; BENGSTRON, G. D. (Ed.). **Sorghum and millets: a second world review**. Pantacheru: International Crops Research Institute for Semi-Arid Tropics, 1992. p. 209-212.

CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. A.; OLIVEIRA, E.; FERREIRA, A. S. Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças. In : VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. cap. 22, p.1025-1063.

CAZORLA, F. M.; ROMERO, D.; PEREZ-GARCIA, A.; LUGTENBERG, B. J. J.; DE VICENTE, A.; BLOEMBERG, G. Isolation and characterization of antagonistic *Bacillus subtilis* strains from the avocado rhizoplane displaying biocontrol activity. **Journal of Applied Microbiology**, Danvers, v. 103, p. 1950-1959, 2007.

DUNGAN, G. H.; KOEHLER, B. Age of seed corn in relation to seed infection and yielding capacity. **Journal of the American Society of Agronomy**, Geneva, v. 36, n. 5, p. 436-443, 1944.

FERREIRA, J. H. S.; MATTHEE, F. N.; THOMAS, A. C. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 283-287, 1991.

FIGUEIREDO, J. E. F.; GOMES, E. A.; GUIMARÃES, C. T.; LANA, U. G. P.; TEIXEIRA, M. A.; LIMA, G. V. C.; BRESSAN, W. Molecular analysis of endophytic bacteria from the genus *Bacillus* isolated from tropical maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 522-534, 2009.

FISHER, P. J.; PETRINI, O.; LAPPIN SCOTT, H. M. The distribution of some fungal and bacterial endophytes in maize (*Zea mays* L.). **New Phytologist**, Cambridge, v. 122, n. 2, p. 299-305, Oct. 1992.



INIGUEZ, A. L.; DONG, Y.; CARTER, H. D.; AHMER, B. M.; STONE, J. M.; TRIPLETT, E. D. W. Regulation of enteric endophytic bacterial colonization by plant defenses. **Molecular Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v. 18, n. 2, p. 169-178, 2005.

KADO C. I.; HESKETT M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 60, p. 969-976, 1970.

KALITA, P.; BORA, L. C.; BHAGABATI, K.N. Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker. **Indian Phytopathology**, New Delhi, v. 49, p. 234-237, 1996.

KLOEPPER, J. W.; LIFSHITZ, R.; ZABLOTOWICZ, R. M. Free-living bacteria for enhancing crop productivity. **Trends in Biotechnology**, Amsterdam, v. 7, p. 39-43, 1989.

KUPPER, K. C.; GIMENES-FERNANDES, N.; GOES, A. Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 3, p. 251-257, 2003.

LIU, C. H.; CHEN, X.; LIU, T. T.; LIAN, B.; GU, Y.; CAER, V.; XUE, Y. R.; WANG, B. T. Study of the antifungal activity of *Acinetobacter baumannii* LCH001 in vitro and identification of its antifungal components. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 76, p. 459-466, 2007.

NIETSCHKE, S. A.; BORÉM, A.; CARVALHOS, G. A.; PAULA JÚNIOR, T. J.; FERREIRA, C. F.; BARROS, E. G.; MOREIRA, M. A. Genetic diversity of *Phaeoisariopsis griseola* in the State of Minas Gerais, Brazil. **Euphytica**, Netherlands, v. 117, p. 77-84, 2001.

PETRAS, S. F.; CASIDA, L. E. J. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 50, p. 1496-1501, 1985.

PIEROBOM, C. R.; DEL PONTE, E. M. (Ed.). **Manual de sanidade de sementes**. Disponível em: <<http://faem.ufpel.edu.br/dfs/patologiasementes/cgi-bin/sementes/procura.cgi>>. Acesso em: 13 jun. 2010.

PINTO, N. F. J. A. **Qualidade sanitária de grãos de milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2001. 4 p. (Embrapa Milho e Sorgo. Comunicado técnico, 30).

PINTO, N. F. J. A.; FERNANDES, F. T.; OLIVEIRA, E. de. Milho (*Zea mays* L.): controle de doenças. In: VALE, F. X. R.; ZAMBOLIM, L. (Ed.). **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Viçosa: UFV, 1997. cap. 17, p. 821-863.

PLEBAN, S.; CHERNIN, L.; CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain of *Bacillus cereus*. **Letters of Applied Microbiology**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 284-288, 1997.

PUSEY, P. L.; WILSON, C. L.; HOTCHKISS, M. W.; FRANKLIN, J. D. Compatibility of *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes, dicloran, and cold-storage conditions. **Plant Disease**, St. Paul, v. 70, p. 587-590, 1986.

PUSEY, P. L.; WILSON, C. L. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. **Plant Disease**, St. Paul, v. 68, p. 753-756, 1984.

RAUPACH, G. S.; KLOEPPER, J. W. Mixtures of plants growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. **Phytopathology**, St. Paul, v. 88, p. 1158-1164, 1998.



REIS, E. M.; CASA, R. T. **Manual de identificação e controle de doenças do milho**. Passo Fundo. Aldeia Norte, 1996.

SCHISLER, D. A.; SLININGER, J. P.; BEHLE, W. R.; JACKSON, A. M. Formulation of *Bacillus* spp. for biological control of plant diseases. **Phytopathology**, St. Paul, v. 94, p. 1267-1271, 2004.

SCHULZ, B.; BOYLE, C. The endophytic continuum. **Mycology Research**, v. 109, n. 6, p. 661-686, 2005.

SESSITSCH, A.; REITER, B.; BERG, G. Endophytic bacterial communities of field-grown potato plants and their plant-growth-promoting and antagonistic abilities. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 50, n. 4, p. 239-249, 2004.

SHURTLEFF, M. C. **Compendium of maize diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 1992.

SONODA, R. M.; GUO, Z. Effect of spray applications of *Bacillus subtilis* on postbloom drop of citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. S52, 1996. Suplemento.

STURZ, A. V.; CHRISTIE, B. R.; MATHESON, B. G.; ARSENAULT, W. J.; BUCHANAN, N. A. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogens. **Plant Pathology**, London, v. 48, p. 360-369, 1999.

STURZ, A. V.; NOWAK, J. Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, p. 183-190, 2000.

TEIXEIRA, H.; MACHADO, J. C.; ORIDE, D.; ALVES, M. C.; NODA, A. Técnica de restrição hídrica: efeito sobre *Acremonium strictum*, protrusão de sementes e obtenção de sementes de milho infetadas. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 109-114, 2005.

TRENTO, S. M.; IRGANG, H. H.; REIS, E. M. Efeito da rotação de culturas, da monocultura e da densidade de plantas na incidência de grãos ardidos em milho. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 609-613, 2002.

WILHELM, E.; ARTHOFER, W.; SCHAFLEITNER, R.; KREBS, B. *Bacillus subtilis*, an endophyte of chestnut (*Castanea sativa*), as antagonist against chestnut blight (*Cryphonectria parasitica*). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, The Hague, v. 52, n. 1/2, p. 105-108, 1998.

ZINNIEL, D. K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N. B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C. A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R. G.; VIDAVER, A. K. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 5, p. 2198-2208, 2002.

WULFF, E. G.; MGUNI, C. M.; MORTENSEN, C. N.; KESWANI, C. L.; HOCKENHULL, J. Biological control of black rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) of brassicas with an antagonistic strain of *Bacillus subtilis* in Zimbabwe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 108, n. 4, p. 317-325, 2002.



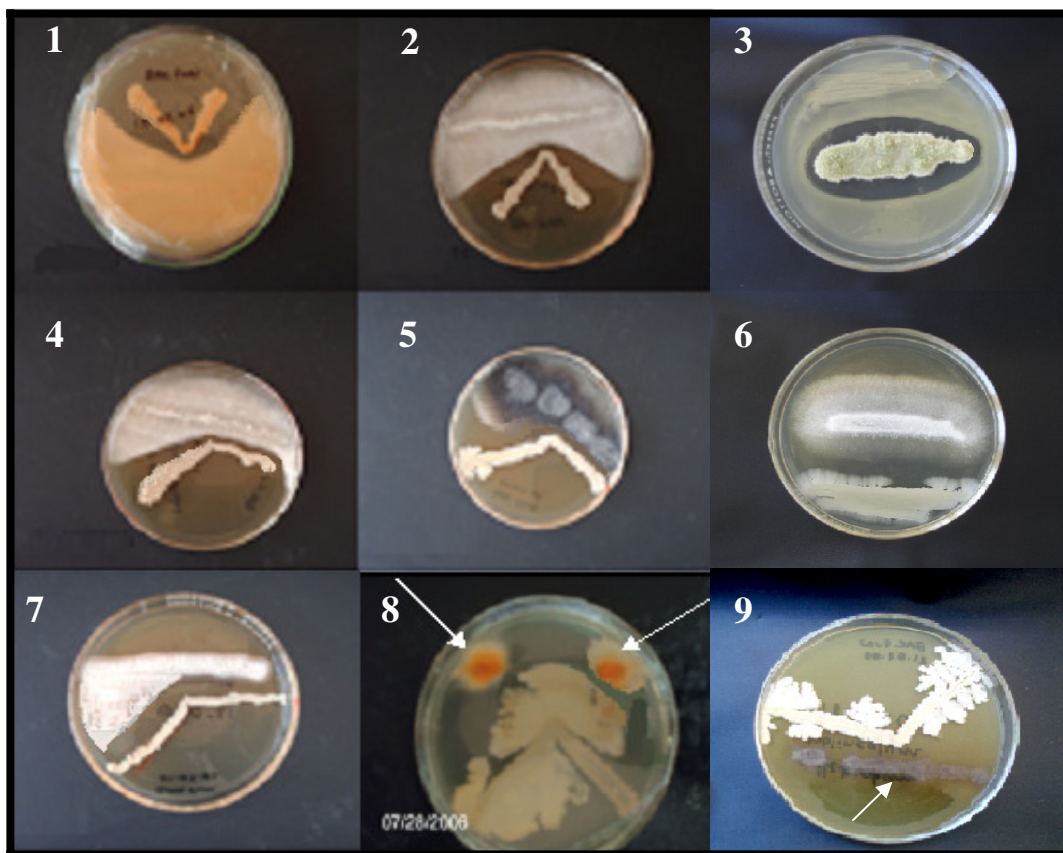


Figura 1. Ensaio de atividade antagonista in vitro com a bactéria CNPMS-22 e fungos fitopatogênicos às culturas do milho e do sorgo. (1) *Fusarium moniliformis*, isolado CNPMS; (2) *F. moniliformis*, isolado 35; (3) *Fusarium moniliformis*, isolado Dourados; (4) *Exserohilum turcicum*; (5) *Aspergillus niger*; (6) *Colletotrichum graminicola*; (7) *F. moniliformis*, isolado 37; (8) *Acremonium strictum*, isolado 26; (9) *Colletotrichum sublineolum*.

