



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

Lida Julieth Caicedo Gegén

**Avaliação de compostos bioativos no controle da mancha foliar de *Glomerella*
em macieira (*Malus domestica* Borkh.)**

FLORIANÓPOLIS

2019

Lida Julieth Caicedo Gegén

**Avaliação de compostos bioativos no controle da mancha foliar de *Glomerella*
em macieira (*Malus domestica* Borkh.)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências
Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

Florianópolis
2019

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

Caicedo-Gegén, Lida Julieth

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS NO CONTROLE DA
MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA EM MACIEIRA (*Malus
domestica* Borkh.) / Lida Julieth Caicedo-Gegén;
orientador, Marciel J. Stadnik, 2019.

87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias,
Programa de Pós Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2.
Colletotrichum fructicola. 3. Extratos fúngicos. 4.
Polissacarídeos algais. 5. Fertilizantes foliares.
I. Stadnik, Marciel J. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

Lida Julieth Caicedo Gegén

Avaliação de compostos bioativos no controle da mancha foliar de *Glomerella* em macieira (*Malus domestica* Borkh.)

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

Prof. Pedro Mondino, Dr.

Universidad de la República

Prof. Robson Marcelo Di Piero, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Aline Cristina Velho, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina

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

Prof. Dr. Cláudio Roberto Fonsêca Sousa Soares

Coordenador do Programa

Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

Orientador

Florianópolis, 13 de agosto de 2019.

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas à minha família, por sempre me apoiar e nunca perder a fé nos meus sonhos.

Mãe, seu cuidado e dedicação foi que deram a esperança para seguir.

Pai, seu amor significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de desempenhar este trabalho;

À Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos;

Ao Professor Dr. Marciel J. Stadnik pela oportunidade de desempenhar este trabalho;

Aos Professores do curso, agradecimentos especiais aos Professores Dr. Robson Marcelo di Piero e Dr. Maurício Sedrez dos Reis;

Ao Dr. Mateus Brusco de Freitas pelo constante acompanhamento e orientações durante a realização deste trabalho;

À Dra. Aline Cristina Velho colega que me iniciou nas metodologias associadas a este trabalho;

À Debora Fialho, pelo acompanhamento e auxílio no desempenho de atividades relacionadas a este trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Fitopatologia pela amizade, afeto, colaboração e parceria durante todo o desempenho deste trabalho;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“Aos homens é isso impossível, mas a Deus tudo é possível.”
Mateus 19:26

RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG), causada por *Colletotrichum* spp., é uma doença emergente e tem-se tornado uma grande preocupação para os produtores brasileiros de macieira. Tradicionalmente, o manejo da doença é feito pelo uso de controle químico e cultivares resistentes. Porém, a busca por novas alternativas amigáveis ao ambiente e à saúde humana são necessárias para o controle da MFG. Assim, o objetivo do trabalho foi testar o potencial de polissacarídeos algais, extratos fúngicos e fertilizantes foliares para o controle da MFG causada por *Colletotrichum fructicola* em macieira, assim como o seu efeito sobre o crescimento micelial e a germinação dos conídios. Para tanto, plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cv. Gala foram cultivadas em casa de vegetação e tratadas 3 dias antes da inoculação. Para verificar o efeito local, as plantas foram inoculadas com uma suspensão conidial (1×10^6 conídios.mL⁻¹). A severidade da doença foi avaliada 3 dias após a inoculação em folhas superiores e inferiores. Os tratamentos que reduziram a doença foram testados *in vitro*. Nas folhas superiores, Reference®, I-carragenana e ulvana reduziram a MFG em 42, 42 e 31 %, respectivamente. Nenhum tratamento afetou a severidade da doença nas folhas inferiores. Nos testes *in vitro*, Reference®, I-carragenana e ulvana estimularam a formação de múltiplos tubos germinativos, enquanto apenas o Reference® reduziu o crescimento micelial de *C. fructicola*.

Palavras-chave: *Colletotrichum fructicola*. Polissacarídeos algais. Carragenana. Ulvana. Efeito fungistático.

ABSTRACT

Glomerella leaf spot (GLS) caused by *Colletotrichum* spp. is an emerging disease and has become a major concern for Brazilian apple producers. Traditionally, disease management has been done through chemical control and resistant cultivars. However, new friendly alternatives for the environment and human health are necessary to control disease. Thus, this work aimed to test the potential of algae polysaccharides, fungal derivatives and leaf fertilizers for GLS control caused by *Colletotrichum fructicola* in apple plants, as well as their effect on mycelial growth and conidial germination. For this, apple plants (*Malus domestica* Borkh.) cv. Gala were cultivated under greenhouse conditions and sprayed with treatments 3 days before inoculation. To verify the local effect, the plants were inoculated with a conidial suspension (1×10^6 conidia.mL⁻¹). The disease severity was assessed 3 days after inoculation in the upper and lower leaves. Treatments which reduced the GLS severity were tested *in vitro* by mycelial growth and conidial germination. Reference[®], ι-carrageenan and ulvan reduced GLS in the upper leaves by 42, 42 and 31 %, respectively. No treatment affected the severity of the disease in the lower leaves. In the *in vitro* tests, Reference[®], ι-carrageenan and ulvan stimulated multiple germ tubes formation, while mycelial growth was reduced by Reference[®].

Keywords: *Colletotrichum fructicola*. Algal polysaccharides. Carrageenan. Ulvan. Fungistatic effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Quantidade produzida de macieira, média 1994-2017.....	23
Figura 2 - Mapa das áreas produtoras de macieira no Sul do Brasil.....	24
Figura 3 - Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> causada por <i>Colletotrichum fructicola</i> em cultivar Gala: folhas jovens com lesões avermelhadas 24 horas após a inoculação (a), folhas jovens encarquilhadas e ressecadas 96 horas após a inoculação (b), colônia de 9 dias do isolado MANE 147- <i>C. fructicola</i> (c) e estruturas pré-infectivas de <i>C. fructicola</i> 10 horas após a incubação (d).....	27
Figura 4 - Teste de seleção de segregantes. A primeira folha completamente expandida foi destacada, e duas gotas (setas) de uma suspensão de conídios de <i>Colletotrichum fructicola</i> (10^6 conídios.mL ⁻¹) foram depositadas em cada lado da folha (a) para testar reações de resistência (incompatível) (b) ou suscetibilidade (compatível) (c) 8 dias após a inoculação.	40
Figura 5 – Micrografias de luz da germinação de conídios de <i>Colletotrichum fructicola</i> : conídio com apressório pedicelado (> 10 µm) (a), conídio com apressório séssil (≤ 10 µm) (b), conídio com múltiplos tubos germinativos (c) e conídio com tubo germinativo ramificado (d).	45
Figura 6 – Sintomas da Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> causados por <i>Colletotrichum fructicola</i> em folhas superiores de macieira tratadas com água (a), ulvana (b), ι-carragenana (c) e Reference® (d) 3 dias após a inoculação.	48
Figura 7 – Crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em meio BDA suplementado com ulvana (a), ι-carragenana (b) e Reference® (c) após 9 dias de incubação.....	50
Figura 8 - Crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em função da concentração de ulvana (a), ι- carragenana (b) e Reference® (c).	51
Figura 9 - Crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em presença de molibdato de sódio, sulfato de manganês, sulfato de zinco, uréia e Reference®.....	52
Figura 10 – Crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em meio BDA suplementando com molibdato de sódio, Reference®, sulfato de manganês, sulfato de zinco e uréia após 9 dias de incubação.	52
Figura 11 – Germinação de conídios de <i>Colletotrichum fructicola</i> na presença de ulvana (a, d, g), ι- carragenana (b, e, h) e Reference® (c, f, i) após 8 horas de incubação.....	54

Figura 12 – Micrografias de luz da germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola* em membrana de celofane com água (a) e nas maiores concentrações de ulvana (b), ι- carragenana (c) e Reference® (d) após 8 horas de incubação.....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos bioativos para o controle de doenças vegetais.....	30
Tabela 2 - Compostos bioativos testados para o controle da Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> em plantas de macieira cv. Gala. Os tratamentos foram aspergidos até o ponto de escoamento 3 dias antes da inoculação com <i>Colletotrichum fructicola</i>	42
Tabela 3 - Efeito de compostos bioativos na severidade da Mancha Foliar de <i>Glomerella</i> causada por <i>Colletotrichum fructicola</i> em plantas de macieira (<i>Malus domestica</i> Borkh.) 3 dias após a inoculação.	49
Tabela 4 – Porcentagem de formação de apressório séssil ou pedicelado e de ramificações do tubo germinativo e comprimento do tubo germinativo de <i>Colletotrichum fructicola</i> em presença de ulvana, I- carragenana e Reference® em membrana de celofane.....	55

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A - Características gerais dos produtos da Linha BioUp da empresa Biosul Fertilizantes.	72
ANEXO B – Controle químico da Mancha Foliar de Glomerella em macieira. ...	73
ANEXO C - Análises de variância em parcela subdividida ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a severidade (%) da Mancha Foliar de Glomerella aos 3 dias após a inoculação com <i>Colletotrichum fructicola</i> em plantas de macieira.	74
ANEXO D - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para a severidade da Mancha Foliar de Gala em plantas de macieira tratadas com compostos bioativos.....	76
ANEXO E - Teste t ($P \leq 0,01$) para a severidade da Mancha Foliar de Glomerella nonas testemunhas (água, meio CDB) aos 3 dias após a inoculação com <i>Colletotrichum fructicola</i> em folhas superiores e inferiores de plantas de macieira.....	78
ANEXO F - Teste t ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a porcentagem da severidade da Mancha Foliar de Glomerella aos 3 dias após a inoculação com <i>Colletotrichum fructicola</i> em folhas superiores de plantas de macieira.....	79
ANEXO G - Teste t ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a porcentagem da severidade da Mancha Foliar de Glomerella aos 3 dias após a inoculação com <i>Colletotrichum fructicola</i> em folhas inferiores de plantas de macieira.....	80
ANEXO H - Análise de variância ($P \leq 0,05$) para a taxa de crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em médio BDA suplementado com Reference®, I- carragenana e ulvana.....	81
ANEXO I - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para o efeito de Reference® na taxa de crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em meio BDA suplementado.	82
ANEXO J - Análise de variância ($P \leq 0,05$) para a regressão linear da porcentagem de germinação de conídios de <i>Colletotrichum fructicola</i> em presença de Reference®, I-carragenana e ulvana.	83

ANEXO K – Estimativa dos parâmetros ($P \leq 0,05$) para a regressão da porcentagem de germinação de conídios com um único apressório de <i>Colletotrichum fructicola</i> em presença de Reference[®], ι-carragenana e ulvana.	84
ANEXO L - Estimativa dos parâmetros ($P \leq 0,05$) para a regressão da porcentagem de germinação de conídios com um único apressório e múltiplos tubos germinativos de <i>Colletotrichum fructicola</i> em presença de Reference[®], ι- carragenana e ulvana.....	85
ANEXO M - Análise de variância ($P \leq 0,05$) para a regressão linear do crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em presença de Reference[®] e o seus compostos individuais.....	86
ANEXO N - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para o efeito de Reference[®] e seus compostos individuais na taxa de crescimento micelial de <i>Colletotrichum fructicola</i> em meio BDA suplementado.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE - Água destilada estéril

ANVISA - Agência Nacional De Vigilância Sanitária Brasileira

AP - Apressório

Aut. - Autoclavado

BDA - Batata dextrose ágar

CBD - Caldo batata dextrose

Cf - Colletotrichum fructicola

CA - Conídios com um único apressório

CG - Conídios germinados

CN - Conídio

CM - Conídios com um apressório e múltiplos tubos germinativos

cm - centímetro

DIC - Desenho inteiramente casualizado

f.sp. - *forma specialis*

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MFG - Mancha Foliar de Glomerella

OCs - Oligo-carragenanas

PR - Paraná

RS - Rio Grande do Sul

SC - Santa Catarina

TG - Tubo germinativo

TGs - Tubos germinativos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
1.1. OBJETIVOS	20
1.1.1. Objetivo Geral	20
1.1.2. Objetivos Específicos	20
1.2. HIPÓTESE	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA MACIEIRA	22
2.2. A CULTURA DA MACIEIRA NO MUNDO E NO BRASIL	23
2.3. MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA	25
2.4. COMPOSTOS BIOATIVOS	29
2.4.1. Polissacarídeos algais	31
2.4.1.1. Carragenanas	32
2.4.1.2. Fucoïdanas	33
2.4.1.3. Ulvanas.....	33
2.4.2. Extratos fúngicos	34
2.4.2.1. Glucosamina.....	36
2.4.3. Fosfitos de potássio	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. LOCALIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL	39
3.2. MATERIAL BIOLÓGICO	39
3.3. SELEÇÃO DE GENÓTIPOS SEGREGANTES	39
3.4. TRATAMENTOS	40
3.5. INOCULAÇÃO	42
3.6. AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA DOENÇA	43
3.7. CRESCIMENTO MICELIAL <i>IN VITRO</i>	43
3.8. GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS <i>IN VITRO</i>	44
3.9. DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
4. RESULTADOS	48
4.1. EFEITO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NA SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA	48
4.2. EFEITO NO CRESCIMENTO MICELIAL DE <i>Colletotrichum fructicola</i> ..	49

4.3. EFEITO NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E NA FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS.....	52
5. DISCUSSÃO	57
6. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS.....	89

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é um dos cultivos frutícolas mais importantes do mundo, ocupa 5 milhões de hectares e a sua colheita gira em torno de 89 milhões de toneladas ao ano (FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS DIVISION, 2019).

No Brasil, a macieira está entre as quatro frutíferas mais comercializadas e o cultivo nacional ocupa 33 mil hectares com uma produção total de 1,3 milhões de toneladas ao ano (FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS DIVISION, 2019). Além disso, a atividade envolve em torno de 3 mil produtores e gera aproximadamente 150 mil empregos (PETRI *et al.*, 2011).

Na dependência da localização do cultivo, a produtividade pode ser afetada negativamente pelo baixo número de horas de frio, que gera brotação e floração deficiente. Por sua vez, a alta precipitação e umidade relativa do ar na primavera e no verão favorecem o desenvolvimento de doenças fúngicas (BONETI *et al.*, 2006).

Entre as doenças da macieira de maior preocupação no Brasil, China, Estados Unidos e Uruguai está a Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG). Cultivares descendentes da cv. Golden Delicious, suscetíveis à doença, são amplamente cultivadas nestes países (CASANOVA *et al.*, 2017; GONZÁLEZ; SUTTON, 1999; LEITE JR; TSUNETI; KISHINO, 1988; WANG *et al.*, 2012). No Brasil, a doença é causada principalmente pelo fungo *Colletotrichum fructicola* (VELHO; STADNIK; WALLHEAD, 2019) e a sua incidência vem aumentando a cada ciclo produtivo, ocasionando perdas significativas, desfolhamento severo e conseqüentemente, reduzindo o rendimento nos anos seguintes (ARAÚJO; STADNIK, 2013; BECKER; KATSURAYAMA; BONETI, 2000).

O controle da MFG é feito principalmente por meio de aplicações foliares de fungicidas baseadas em sistemas de previsão (BECKER; KATSURAYAMA; BONETI, 2000). Entre os sistemas mais populares atualmente está aquele onde os fungicidas são pulverizados um a dois dias antes de períodos chuvosos e repetidas quando o acúmulo de chuva for maior de 30 mm (KATSURAYAMA; BONETI, 2009; VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) brasileiro autoriza fungicidas protetores como ditiocarbamatos, fenilpiridinaminas e isoftalonitrilos, e fungicidas sistêmicos como benzimidazóis, carboxamidas, estrobilurinas e triazóis para o controle da

MFG. Porém, a maioria destes agrotóxicos possuem classificação ambiental: perigosa ou muito perigosa ao meio ambiente (HERNÁNDEZ; MENDES, 2018).

Sabe-se que o uso excessivo de fungicidas tem desvantagens como a seleção de patógenos resistentes (BOSCH *et al.*, 2014), os distúrbios ambientais pela falta de seletividade dos produtos utilizados e a toxicidade residual no solo, água e nos alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016; STADNIK; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009). Além disso, monitoramentos recentes concluíram que a maçã é o décimo segundo alimento com mais resíduos de agrotóxicos que representam um risco para a saúde do consumidor brasileiro (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

As constantes preocupações com o ambiente e a saúde humana têm levado muitos profissionais à pesquisa de métodos alternativos para o controle de fitopatógenos. Entre as novas alternativas que vêm ganhando relevância nos últimos anos, os polissacarídeos obtidos de algas marinhas têm mostrado potencial para o controle de doenças vegetais (STADNIK; DE FREITAS, 2014). O tratamento com ulvana reduziu a MFG causada por *C. fructicola* em macieira (ARAÚJO *et al.*, 2008) e as doenças causadas por *Colletotrichum lindemuthianum* (PAULERT *et al.*, 2009) e *Fusarium oxysporum* em feijoeiro (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). Por sua vez, as carragenanas apresentaram potencial para o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de *Arabidopsis thaliana* (SANGHA *et al.*, 2010). Similarmente, o uso de fucoidanas em tomateiro ofereceu proteção significativa contra *Botrytis cinerea*, *Oidium* spp. e *Phytophthora infestans* (SBAIHAT *et al.*, 2015). Em videira, o extrato de *Ascophyllum nodosum* reduziu as doenças causadas por *Plasmopora viticola*, *Phytophthora capsici* (LIZZI *et al.*, 1998) e *Phaeomoniella chlamydospora* (DI MARCO; OSTI, 2009).

Moléculas de origem fúngica também têm demonstrado potencial na proteção de plantas contra patógenos. Por exemplo, Viecelli *et al.* (2010) mostraram redução da mancha angular de feijoeiro pelo uso do extrato aquoso do micélio de *Pycnoporus sanguineus*. Similarmente, extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* reduziram local e sistemicamente a severidade da antracnose em plantas de pepino (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004). Por sua vez, quitinas e quitosanas derivadas de fungo reduziram as lesões causadas por *Botrytis cinerea* e *Penicillium expansum* em macieira (WU *et al.*, 2005).

Compostos inorgânicos como os fosfitos também têm apresentado efeito curativo da MFG em macieira. Além disso, atividade antimicrobiana *in vitro* sobre o crescimento

micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* foi comprovada (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010). Contudo, o uso de fosfitos induziu resistência contra *Phytophthora cryptogea* em feijão fradinho (SAINDRENAN *et al.*, 1988).

O uso de compostos bioativos tanto isolados quanto misturados em fertilizantes foliares comerciais vêm ganhando espaço no manejo de doenças (ARAÚJO *et al.*, 2008; DI MARCO; OSTI, 2009; SBAIHAT *et al.*, 2015; VIECELLI *et al.*, 2010). Por exemplo, a empresa brasileira Biosul fertilizantes comercializa alguns produtos contendo compostos bioativos, e o seu uso permanece como um potencial para o controle de doenças vegetais: Reference[®] é uma formulação do extrato de *Ascophyllum nodosum* (6 %) misturado com macronutrientes, micronutrientes, aminoácidos e uréia (BIOSUL FERTILIZANTES, 2017a). Por sua vez, Ativa[®] é uma solução de glucosamina de origem orgânica, não tóxico e biodegradável (BIOSUL FERTILIZANTES, 2017a). Por fim, Aminophito 40[®] é uma composição de 40 % de fósforo (P_2O_5) e 20 % de potássio (K_2O) aditivado com 10 % de aminoácidos (BIOSUL FERTILIZANTES, 2017a).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar e comparar o efeito de diferentes compostos bioativos para o controle da Mancha Foliar de *Glomerella* em plantas de macieira cv. Gala, assim como o seu efeito sobre o crescimento micelial e a germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola*.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1. Objetivo Geral

Avaliar e comparar o efeito de compostos bioativos para o controle da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira.

1.1.2. Objetivos Específicos

Avaliar a severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* em plantas de macieira tratadas com polissacarídeos algais, extratos de culturas *in vitro* de *Colletotrichum fructicola* e fertilizantes foliares em função da posição da folha;

Verificar o efeito protetor da ulvana sobre a Mancha Foliar de *Glomerella* em folhas superiores de plantas de macieira cv. Gala;

Determinar o efeito de Reference[®], I-carragenana e ulvana sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola*;

Avaliar a germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola* em presença de Reference[®], I-carragenana e ulvana.

1.2. HIPÓTESE

Os compostos bioativos derivados de algas marinhas, de culturas *in vitro* de *Colletotrichum fructicola* e fertilizantes foliares controlam a Mancha Foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum fructicola* em macieira.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. DESCRIÇÃO BOTÂNICA DA MACIEIRA

Malus domestica Borkh. popularmente conhecida como macieira, pertence à família Rosaceae, subfamília Spiraeoideae e gênero *Malus* (INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM (ITIS), 2018; JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2018; POTTER *et al.*, 2007). O centro de origem da macieira domesticada está na região do Turquistão, na Ásia Central, onde o seu ancestral (*Malus sieversii*) foi localizado por Vavilov (PEREIRA-LORENZO; RAMOS-CABRER; FISCHER, 2009).

A macieira é uma frutífera, perene e caducifólia de folhas simples, elípticas e alternadas, com margens serradas e de tons verdes escuros. Esta árvore tem tronco de casca parda e lisa, e pode chegar a alguns metros de altura. As flores são aromáticas, brancas ou rosas, agrupadas em pequenas inflorescências (BONETI *et al.*, 2006). Devido ao mecanismo de auto-incompatibilidade que impede a fertilização por autopolinização, as cultivares de macieira requerem polinização cruzada (VISSER, 1981). Assim, em um pomar, dois ou mais cultivares são plantadas para uma alta eficiência da polinização (PETRI, 2011). Os frutos apresentam diversas cores que vão desde o vermelho escuro até o verde, de forma globosa ou alongada com uma profunda depressão no ponto de inserção da haste que os prendem aos ramos (BONETI *et al.*, 2006).

A árvore passa por duas fases durante o seu ciclo anual: a de dormência e a de crescimento vegetativo e reprodutivo. Assim, ao final de junho e até setembro a macieira entra em repouso hibernar (FRANCESCATTO *et al.*, 2015). Porém, os requerimentos de frio hibernar variam entre as diferentes cultivares, podendo ser desde menos de 200 horas para a cv. Anna e até mais de 1.000 horas para a cv. Golden Delicious. As cultivares Gala e Fuji precisam em torno de 600 horas de frio (≤ 7 °C) para brotarem e florescerem uniformemente (PETRI *et al.*, 2011). Após a quebra da dormência, ocorre a brotação até início de outubro. Posteriormente, acontece a floração em meados de outubro e os primeiros frutos aparecem no fim do mês. Na dependência da cultivar, os frutos se desenvolvem até o início de fevereiro quando a colheita pode acontecer (FRANCESCATTO *et al.*, 2015).

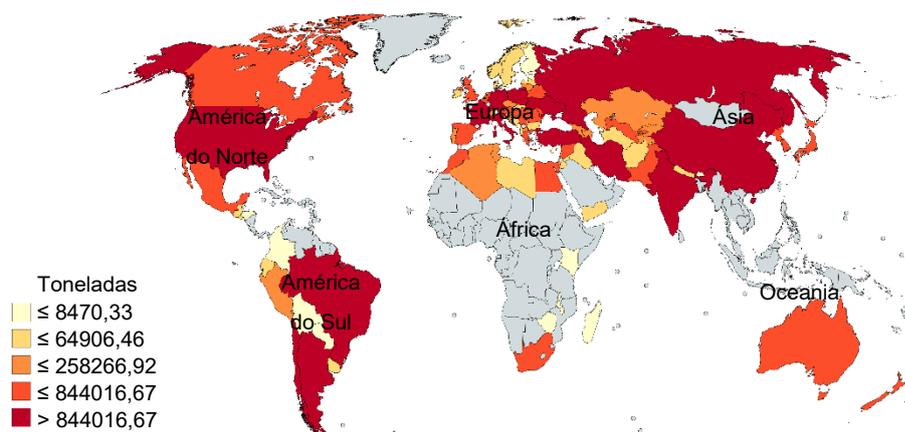
A necessidade de frio é um dos fatores limitantes da produção de macieira. Assim, áreas com alta intensidade de luz, dias quentes e noites frias permitem uma melhor adaptação da espécie. Porém, a duração dos diferentes estados fenológicos pode variar

dependendo das particularidades climáticas de cada região (BONETI *et al.*, 2006; THE CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY'S PLANT AND BIOTECHNOLOGY RISK ASSESSMENT, 2014).

2.2. A CULTURA DA MACIEIRA NO MUNDO E NO BRASIL

A macieira é um dos principais cultivos frutícolas das regiões temperadas do mundo e de algumas áreas subtropicais mais elevadas (O'ROURKE, 2003). Esta frutífera é amplamente cultivada na Argentina, Brasil, Chile, China, Estados Unidos, França, Índia, Irã, Itália, Polônia, Rússia e Turquia (Figura 1). Em 2017, a área mundial cultivada ocupou 4,9 milhões de hectares com uma produção total em torno de 83 milhões de toneladas. A Ásia é responsável por 58 % da produção, seguida da Europa com 24 % e as Américas com 14 % (FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS DIVISION, 2019).

Figura 1 – Quantidade produzida de macieira, média 1994-2017.



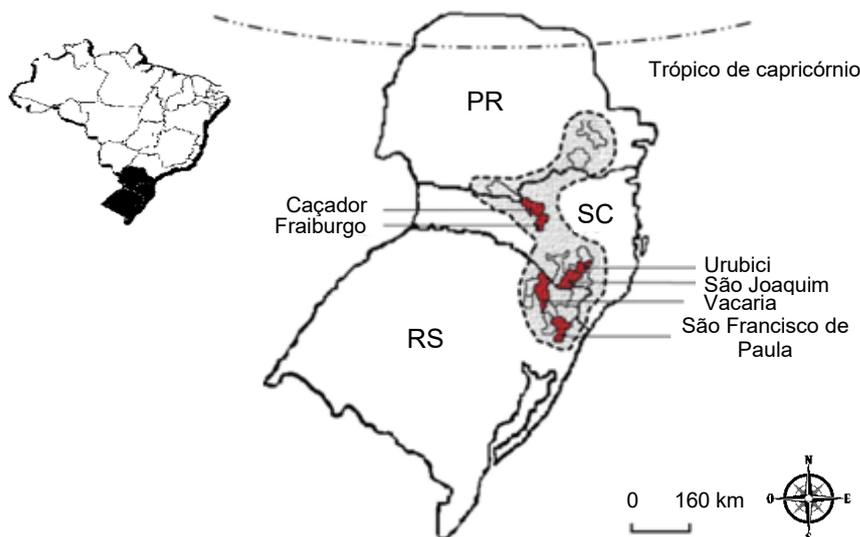
Fonte: adaptado de Food & Agriculture Organization Statistics Division (2019).

No Brasil, a produção comercial de macieira iniciou nos anos 70 com poucos pomares produzindo aproximadamente 13 mil toneladas de frutos. Após a injeção de investimentos governamentais, a produção da macieira chegou a 857 mil toneladas e o país chegou ao status de exportador nos anos 90 (PETRI *et al.*, 2011).

Atualmente, a macieira está entre as quatro frutíferas mais comercializadas no país. Em 2017, a área cultivada foi de 33 mil hectares com uma produção total de 1,3 milhões de toneladas (FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS DIVISION, 2019). O agronegócio da macieira se localiza no sul do país (Figura 2) nos estados de Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS), sendo SC o principal produtor e

contando com 48 % da área total, seguido do RS com 47 % (MING, 2016). Em geral, esta atividade envolve em torno de 3 mil produtores, gerando aproximadamente 150 mil empregos (PETRI *et al.*, 2011).

Figura 2 - Mapa das áreas produtoras de macieira no Sul do Brasil.



As linhas tracejadas delimitam a área produtiva no país. Abreviaturas: Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS).

Fonte: adaptado de Velho *et al.* (2015).

Os genótipos existentes de macieira são muito diversos, entretanto, as cultivares comerciais utilizadas no mundo foram limitadas a um pequeno grupo (PETRI *et al.*, 2011). Nos anos 50, as cultivares mais populares eram a Red Delicious e a Golden Delicious, subsequentemente, chegou ao mercado a Granny Smith como cultivar entressafra. Com a expansão do mercado nos anos 70 a Jonagold, a Gala, a Fuji e a Braeburn ingressaram para satisfazer a crescente demanda mundial (O'ROURKE, 2003). Ainda que na maioria dos países produtores essas cultivares sejam tradicionalmente dominantes nos pomares, novas cultivares foram introduzidas gradualmente para satisfazer aos consumidores e às exigências do mercado (O'ROURKE, 2003).

Atualmente, a Fuji lidera a produção a nível mundial, sendo que a China possui 45 % da sua produção nessa cultivar (O'ROURKE, 2003). No entanto, recentemente a Gala esteve no primeiro lugar de produção nos Estados Unidos e a tendência estimada é para continuar aumentando a sua produtividade (USAPPLE ASSOCIATION, 2018).

No Brasil, destacam-se três cultivares: a Gala, a Fuji e a Eva, consecutivamente (MING, 2016). Em 2017, apesar da Gala ser a principal cultivar ao longo dos anos, a Fuji ultrapassou a sua produção. Porém, a Gala retomou a liderança de volume de produção

no ano seguinte (PÈRÈS, 2018). Além disso, as áreas cultivadas têm apresentado uma tendência decrescente nos últimos anos devido aos altos custos de produção, decorrentes maiormente do manejo de doenças que acometem a cultura (ARAÚJO *et al.*, 2019; MING, 2016). As doenças de verão como a sarna da macieira, a podridão amarga e a macha foliar de *Glomerella* afetam a produção das cultivares descendentes da Golden Delicious, incluindo a Gala, a Pink Lady, a Jonagold e a própria Golden Delicious (ARAÚJO *et al.*, 2017; GONZÁLEZ; SUTTON, 2004). Além disso, a cultivar Granny Smith também tem-se mostrado suscetível (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002; VILLANI, 2018).

2.3. MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

A Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) é uma doença da macieira, típica do verão. As epidemias são mais severas à medida que a temperatura ambiente é elevada de 14 °C para 26 – 28 °C e inibida totalmente a 34 °C, entanto que o período de molhamento foliar requerido para a infecção varia de 2 horas a 30 °C para 32 horas a 16 °C (CRUSIUS *et al.*, 2002).

No Brasil, a MFG é uma das principais preocupações dos produtores de macieira devido às temperaturas elevadas e precipitações frequentes predominantes durante o verão (CASANOVA *et al.*, 2017; CRUSIUS *et al.*, 2002; GONZÁLEZ; SUTTON, 1999; STADNIK; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009; WANG *et al.*, 2012). No entanto, a doença também foi reportada nos Estados Unidos (GONZÁLEZ; SUTTON, 1999), na China (WANG *et al.*, 2012) e mais recentemente no Uruguai (CASANOVA *et al.*, 2017). A MFG afeta as cultivares de macieira descentes da Golden Delicious. Assim, a principal cultivar plantada no país, a Gala, é altamente suscetível à doença. Contudo, cultivares descendentes da Red Delicious, como a Fuji, apresentam resistência completa à doença e têm caráter monogênico recessivo (STADNIK; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009).

Conforme Velho, Stadnik e Wallhead (2019) *Colletotrichum fructicola* Prihastuti, Cai & Hyde (anteriormente designado *Colletotrichum gloeosporioides*, teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & H. Schrenk) é a espécie mais frequente causando MFG no Brasil.

O processo infeccioso de *C. fructicola* inicia com os eventos de pré-penetração: os conídios (Figura 3, d) se aderem às células da epiderme e projetam um tubo germinativo. No extremo deste tubo se forma um apressório séssil (tubo germinativo ≤

10 μm) ou pedicelado (tubo germinativo $> 10 \mu\text{m}$), inicialmente hialino (ARAÚJO; GONÇALVES; STADNIK, 2014; GONÇALVES; STADNIK, 2012; VELHO *et al.*, 2016). Em seguida, a melanização do apressório e a formação de uma hifa de penetração permitem a entrada direta do fungo nas células da epiderme, o que acontece pela combinação de força mecânica e a degradação enzimática da cutícula e da parede celular vegetal (LUDWIG *et al.*, 2014; O'CONNELL *et al.*, 2012).

A colonização do fungo é caracterizada por um ciclo de vida hemibiotrófico. Assim, durante a fase biotrófica, relativamente rápida, o fungo desenvolve hifas espessas. Estas hifas permanecem envolvidas pela membrana plasmática intacta da célula hospedeira e espalham-se pelo tecido vegetal através das células vivas. Posteriormente, durante a fase necrotrófica ocorre uma diferenciação em hifas finas, altamente destrutivas, que matam e necrosam os tecidos da planta e geram os sintomas da doença (LIANG *et al.*, 2018).

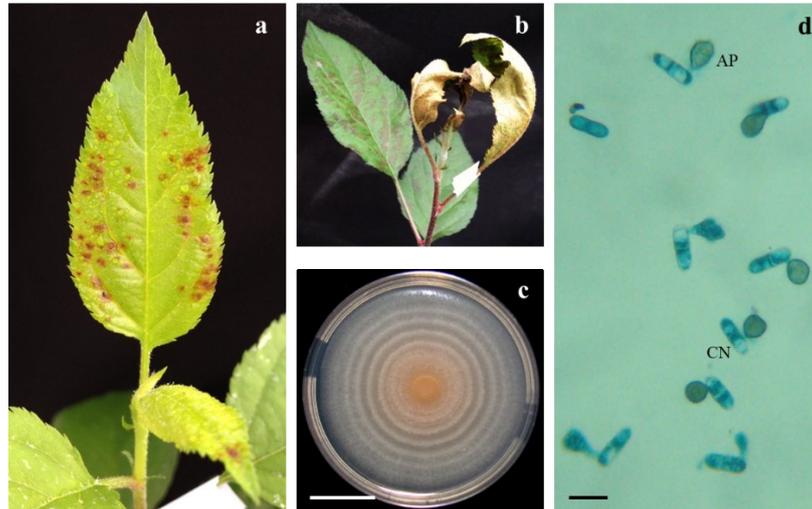
Nas folhas, os sintomas podem surgir 2 dias após a infecção, caracterizados por lesões avermelhadas que crescem irregular e rapidamente, coalescem e formam lesões necróticas (Figura 3). Após 8-10 dias as folhas podem desidratar, apresentar clorose e finalmente cair, o que geralmente acontece durante o verão quando nenhum tratamento é utilizado. Estudos demonstraram que as folhas mais velhas da cv. Gala são menos suscetíveis à MFG do que as folhas mais jovens. É um tipo de resistência dependente da idade do tecido conhecida como resistência ontogênica (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAUJO; STADNIK, 2013).

Esta devastadora doença fúngica pode causar desfolhamento precoce e conseqüentemente diminuição do vigor da planta no inverno, resultando em uma redução de até 75 % na produção dos anos seguintes (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAUJO; STADNIK, 2013; CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992; CRUSIUS *et al.*, 2002). Além disso, o agente causal pode infectar os frutos diretamente e reduzir a sua qualidade. Nos frutos, os sintomas são pequenas pontuações marrom-claras a marrom-escura, deprimidas, circulares, de 1-3 mm de diâmetro que não coalescem (ROCKENBACH *et al.*, 2016; SUTTON; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1998).

O *Colletotrichum* spp. sobrevive principalmente nos ramos das plantas dormentes durante o inverno, garantindo a sua presença nas seguintes estações (CASANOVA *et al.*, 2016). Massas acinzentadas de micélio, típicas do fungo, foram observadas em plantas de macieira. Além disso, isolados recuperados de gemas e ramos durante o outono e o inverno foram capazes de causar a doença. Assim, conídios viáveis em plantas dormentes contribuem como inóculo primário, entanto que o fungo não foi detectado em frutos

mumificados, nem em restos culturais coletados do solo (CASANOVA *et al.*, 2016; CRUSIUS *et al.*, 2002).

Figura 3 - Mancha Foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum fructicola* em cultivar Gala: folhas jovens com lesões avermelhadas 24 horas após a inoculação (a), folhas jovens encarquilhadas e ressecadas 96 horas após a inoculação (b), colônia de 9 dias do isolado MANE 147-*C. fructicola* (c) e estruturas pré-infectivas de *C. fructicola* 10 horas após a incubação (d).



Abreviaturas: Conídio (CN), apressório (AP). Barras: 30 mm (c), 15 µm (d).
Fonte: desenvolvido pelo autor.

As condições temporais são fundamentais para o desenvolvimento da MFG. Assim, sistemas de previsão utilizam essas informações para auxiliar aos produtores nas tomadas de decisão. Estes dados permitem que os fruticultores definam o momento correto para o início do controle químico, evitando pulverizações desnecessárias e o aumento dos custos de produção. A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) desenvolveu um sistema online para monitorar e alertar sobre os períodos favoráveis para o desenvolvimento da doença: AgroAlerta. Atualmente, a Epagri conta com 34 estações agrometeorológicas automáticas para a cultura da macieira, sendo 29 em SC, 4 em RS e uma em PR (ARAÚJO *et al.*, 2017).

O controle químico inicia no inverno quando as plantas são protegidas com produtos cúpricos com o objetivo de reduzir as fontes de inóculo. Com a chegada da primavera recomenda-se o uso de fungicidas como mancozeb, captan, chlorothalonil e dithianon (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2004). Segundo os sistemas de previsão, as aplicações devem ser feitas um a dois dias antes de períodos chuvosos e repetidas quando o acúmulo de chuva for maior de 30 mm (KATSURAYAMA; BONETI, 2009; VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002). Após a colheita, as plantas infectadas devem continuar sendo tratadas até o fim de março com o objetivo de reduzir o inóculo e evitar

o desfolhamento precoce. Durante esse período, o uso alternado de mancozeb, enxofre ou oxiclureto de cobre é recomendado (VALDEBENITO-SANHUEZA, 2004; VALDEBENITO-SANHUEZA; SPADOA; MINUZZO, 2018). Assim, o controle químico da MFG pode chegar a 12-16 pulverizações por safra (VALDEBENITO-SANHUEZA *et al.*, 2002).

Apesar da MFG ameaçar o uso da cv. Gala, o manejo químico tem tornado viável a sua produção no Brasil (BECKER; KATSURAYAMA; BONETI, 2000; PETRI *et al.*, 2011). Atualmente, 42 agrotóxicos são autorizados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da doença no país. Assim, fungicidas protetores como os ditiocarbamatos, fenilpiridinaminas e isoftalonitrilos são utilizados. Além disso, fungicidas sistêmicos como benzimidazóis, carboxamidas, estrobilurinas e triazóis complementam o controle da MFG. Porém, 41 destes agrotóxicos são perigosos ou muito perigosos ao meio ambiente segundo a classificação ambiental (HERNÁNDEZ; MENDES, 2018).

Ao longo do tempo, o uso excessivo de agrotóxicos tem mostrado desvantagens como a perda da eficácia devido à seleção de patógenos resistentes (BOSCH *et al.*, 2014), os distúrbios ambientais pela falta de seletividade dos produtos utilizados e a toxicidade no solo, água e nos alimentos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016; STADNIK; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA) tem monitorado, nas últimas décadas, os níveis de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* que chegam à mesa do consumidor. O mais recente monitoramento mostrou que apenas o 1 % das amostras de maçã estava livre de agrotóxicos, enquanto o 88 % apresentava concentrações iguais ou menores do Limite Máximo de Resíduo (LRM) aceitável. Além disso, foram detectados 47 agrotóxicos diferentes, incluindo alguns não autorizados para o cultivo, de entre um total de 185 agrotóxicos monitorados. O grupo dos ditiocarbamatos (88 % das amostras), carbendazim (68 % das amostras) e acetamipride (47 % das amostras) apresentaram o maior número de detecções nas amostras analisadas. Por fim, o monitoramento concluiu que a maçã é o décimo segundo alimento com mais resíduos de agrotóxicos que representam um risco para a saúde do consumidor (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2016).

Desde que a demanda dos consumidores por produtos orgânicos e alimentos social, ambiental e economicamente sustentáveis tem aumentado (STADNIK; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA, 2009), métodos alternativos para o controle de fitopatógenos

como os compostos bioativos vêm ganhando relevância nos últimos anos (STADNIK; DE FREITAS, 2014).

2.4. COMPOSTOS BIOATIVOS

Um composto bioativo é qualquer substância aplicada a plantas que modula um ou mais processos metabólicos e que desencadeia mudanças fisiológicas no organismo, independentemente do seu conteúdo nutricional (GRY *et al.*, 2007; GUAADAQUI *et al.*, 2014). A origem dos compostos bioativos pode ser sintética ou natural, ocorrendo geralmente em pequenas quantidades (GUAADAQUI *et al.*, 2014). Porém, a dosagem utilizada determinará os efeitos benéficos ou tóxicos no organismo (GRY *et al.*, 2007).

Em plantas, os compostos bioativos compreendem metabólitos secundários não imprescindíveis para o funcionamento biológico, mas que têm um papel importante na competição, defesa ou processos de sinalização bioquímica (GRY *et al.*, 2007).

Diversas fontes destes compostos vêm sendo exploradas para o controle de doenças vegetais nas últimas décadas (Tabela 1), entre elas, extratos provenientes de algas (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019; PAULERT *et al.*, 2009), fungos (VIECELLI *et al.*, 2010) e artrópodes (HADWIGER, 2013).

Tabela 1 – Exemplo de compostos bioativos para o controle de doenças vegetais.

Polissacarídeos algais
<p>Carragenanas</p> <p><i>Arabidopsis thaliana/Sclerotinia sclerotiorum</i> (SANGHA <i>et al.</i>, 2010)*</p> <p><i>Nicotiana tabacum</i> (MERCIER <i>et al.</i>, 2001)*</p>
<p>Fucoidanas</p> <p><i>Nicotiana tabacum/VMT</i> (KLARZYNSKI <i>et al.</i>, 2003)*</p> <p><i>Solanum lycopersicum/Botrytis cinerea – Oidium spp. – Phytophthora infestans</i> (SBAIHAT <i>et al.</i>, 2015)</p> <p><i>Vitis vinifera/Phaeomoniella chlamydospora</i> (DI MARCO; OSTI, 2009)</p>
<p>Ulvanas</p> <p><i>Malus domestica/Colletotrichum fructicola</i> (ARAÚJO <i>et al.</i>, 2008; ARAÚJO; STADNIK, 2013)*</p> <p><i>Phaseolus vulgaris/Colletotrichum lindemuthianum – Fusarium oxysporum</i> (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019; PAULERT <i>et al.</i>, 2009)</p>
Extratos fúngicos
<p><i>Pycnoporus sanguineus</i> (VIECELLI <i>et al.</i>, 2010)*</p> <p><i>Lentinula edodes - Agaricus blazei</i> (DI PIERO; PASCHOLATI, 2004)*</p>
<p>Glucosamina</p> <p><i>Malus domestica/Botrytis cinerea – Penicillium expansum</i> (WU <i>et al.</i>, 2005)</p>
Fosfito de potássio
<p>Efeito curativo <i>Malus domestica/Colletotrichum gloeosporioides</i> Efeito inibitório sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (ARAÚJO <i>et al.</i>, 2008; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010)</p>
<p><i>Vigna unguiculata/Phytophthora cryptogea</i> (SAINDRENAN <i>et al.</i>, 1988)*</p>

*Indução de resistência ou de enzimas relacionadas aos mecanismos de defesa.
Fonte: desenvolvido pelo autor.

2.4.1. Polissacarídeos algais

As algas marinhas são organismos muito diversos e frequentes no oceano, possuindo também uma extraordinária diversidade taxonômica e bioquímica. Porém, a exploração do potencial biotecnológico desses organismos e dos seus derivados para a obtenção de compostos bioativos tem sido pouco estudada (STADNIK; PAULERT, 2008). Entretanto, devido à preocupação pela saúde humana e o ambiente, existe uma crescente demanda por produtos bioestimulantes e protetores vegetais eficientes e sustentáveis que situa às algas marinhas como uma fonte potencial de compostos bioativos (STADNIK; DE FREITAS, 2012; STADNIK; PAULERT, 2008).

Tradicionalmente, as algas têm sido utilizadas como fonte de alimento, fertilizantes e outras aplicações industriais pelo seu rápido crescimento que permite uma grande produção de biomassa (STADNIK; PAULERT, 2008). Contudo, as algas marinhas também são fonte de diversos polissacarídeos (ABREU *et al.*, 2008; ARAÚJO; STADNIK, 2013; PAULERT *et al.*, 2007). Além disso, a manufatura não requer síntese química e os derivados podem ser isolados pelo uso de solventes, como água e álcool. Assim, a produção de algas tem uma das maiores relações custo-benefício (STADNIK; DE FREITAS, 2012).

Os polissacarídeos ou glucanas algais são macromoléculas de origem natural e de alto peso molecular que possuem cadeias longas, lineares ou altamente ramificadas. Estas cadeias se podem compor de diferentes monossacarídeos, como glucose, frutose ou gliceraldeído. Entretanto, as diferenças estruturais determinaram as propriedades físico-químicas de cada polissacarídeo (NELSON; COX, 2008).

Os polissacarídeos algais podem ser classificados essencialmente em dois grupos segundo a sua função biológica: polissacarídeos de reserva e polissacarídeos estruturais. Por um lado, a glucose serve como polissacarídeo de reserva quando não está envolvida no metabolismo da energia e é conhecida como amido nas plantas, glicogênio nos animais e laminarina nas algas marrons. Por outro lado, a celulose é um polissacarídeo estrutural da parede celular primária das plantas, oomicetos e outras algas marinhas. Igualmente, a quitina é encontrada nas algas, nas paredes celulares de fungos e no exoesqueleto de artrópodes. Além disso, a quitina está quimicamente relacionada à quitosana, cuja atividade elicitora na resposta de defesa de plantas tem sido reportada (NELSON; COX, 2008).

As plantas possuem enzimas constitutivas capazes de hidrolisar as glucanas. Estas enzimas líticas, conhecidas como glucanases, hidrolisam as β -1,3 glucanas lineares ou ramificadas. Uma vez que as glucanas são uns dos principais constituintes da parede celular fúngica estas enzimas estão envolvidas na defesa vegetal. Assim, as glucanases podem potencialmente degradar os componentes da parede celular dos patógenos e contribuir na expressão da resistência (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Nas últimas décadas, uma ampla gama de efeitos benéficos pelo uso de extratos líquidos de algas marinhas e de polissacarídeos algais foram demonstrados. Por exemplo, a melhora na germinação de sementes (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019), o aumento no rendimento dos cultivos, o aumento na absorção de constituintes inorgânicos do solo (JAYARAMAN; NORRIE; PUNJA, 2011), a maior resistência a condições de estresse (geada, seca), a diminuição das perdas causadas por pragas ou microrganismos durante a armazenagem (KHAN *et al.*, 2009) e a indução de resistência (ARAUJO; STADNIK, 2013).

2.4.1.1. Carragenanas

As carragenanas são uma família de polissacarídeos lineares sulfatados, solúveis em água e extraídos de algas vermelhas (Filo: Rhodophyta). Estas macromoléculas são formadas por unidades repetidas de α -1,4-D-galactose, unidas por ligações do tipo α -1,3 e β -1,4 glicosídeo e substituídas por um, dois ou três grupos éster sulfatos por unidade repetida (DE RUITER; RUDOLPH, 1997).

Existem três tipos principais de carragenanas: kappa (κ), iota (ι) e lambda (λ). Contudo, existem muitas estruturas intermediárias dependendo do número e da posição dos grupos éster sulfato, os quais determinaram as propriedades finais de cada polissacarídeo (DE RUITER; RUDOLPH, 1997). Por exemplo, o controle de *Sclerotinia sclerotiorum* em plantas de *Arabidopsis thaliana* foi efetivo somente quando uma carragenana com maior grau de sulfatação foi utilizada (SANGHA *et al.*, 2010).

O efeito das carragenanas tem sido explicado pela indução de resistência. A infiltração de λ -carragenana em folhas de *Nicotiana tabacum* L. induziu a expressão de genes relacionados à resistência (MERCIER *et al.*, 2001).

2.4.1.2. Fucoïdanas

As fucoïdanas ou fucanas são polissacarídeos lineares ou ramificados, constituídos principalmente por L- fucose sulfatada e extraídos da parede celular de algas marrons (Filo: Phaeophyta), tais como, *Ascophyllum nodosum*, *Ecklonia* spp., *Fucus* spp., *Pelvetia* spp. e *Sargassum* spp. (BERTEAU; MULLOY, 2003; STADNIK; PAULERT, 2008).

O potencial bioativo das fucoïdanas para o controle de doenças vegetais tem sido comprovado em diferentes estudos. O tratamento de células de *N. tabacum* com fucoïdanas, desencadeou resistência local e sistêmica frente ao *Tobacco mosaic virus* (TMV) (KLARZYNSKI *et al.*, 2003). Similarmente, plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) tratadas com o polissacarídeo apresentaram redução significativa das doenças causadas por *Botrytis cinerea*, *Oidium* spp. e *Phytophthora infestans* (SBAIHAT *et al.*, 2015). O extrato de *A. nodosum* também reduziu significativamente o míldio da videira (*Plasmopara viticola*) e a requeima do pimentão (*Phytophthora capsici*) em plantas tratadas em condições de laboratório e casa de vegetação. Além disso, a atividade enzimática das peroxidases e a concentração de fitoalexinas aumentou nos tecidos foliares (LIZZI *et al.*, 1998). Por fim, plantas de videira tratadas com um bioestimulante à base de *A. nodosum* mostraram redução dos sintomas causados por *Phaeomonilla chlamydospora*, além de menor porcentagem de fragmentos foliares com o patógeno (DI MARCO; OSTI, 2009).

Atualmente existem diferentes produtos comerciais (Acadian[®], Marvita Live[®], Synergy[®], entre outros) contendo o extrato puro ou misturado da alga *A. nodosum* e distribuídos em diferentes países como bioestimulantes ou bioprotetores de plantas (TALAMINI; STADNIK, 2004). Estes produtos vêm ganhando relevância nas últimas décadas, uma vez que contribuem no controle de doenças fúngicas com resultados promissores e são potenciais indutores de resistência (JAYARAMAN; NORRIE; PUNJA, 2011). No Brasil, a empresa Biosul Fertilizantes comercializa o Reference[®] (ANEXO A). Esta formulação contém extrato de *A. nodosum* (6 %), macronutrientes, micronutrientes, aminoácidos e uréia (BIOSUL FERTILIZANTES, 2017b).

2.4.1.3. Ulvanas

As ulvanas são heteropolissacarídeos sulfatados, solúveis em água, compostos por ramnose, xilose, glicose, ácidos urônicos, ácidos idurônicos, sulfato e em alguns casos por

manose e galactose. Contudo, a sua composição pode ser muito complexa e sofrer variações (LAHAYE; ROBIC, 2007). Em geral, as ulvanas são extraídas da parede celular de algas verdes do gênero *Ulva*, como *U. fasciata* Delile (ARAÚJO *et al.*, 2008). As espécies deste gênero se encontram amplamente distribuídas pelo mundo e são utilizadas na alimentação humana, na medicina e na agricultura (LAHAYE; ROBIC, 2007).

Diferentes estudos mostram o potencial bioativo da ulvana para o controle de doenças fúngicas. Araújo *et al.* (2008) demonstraram o efeito local da ulvana (10 mg.mL^{-1}) na redução da MFG em plantas de macieira tratadas 3 ou 6 dias antes da inoculação. O tratamento 6 dias antes da inoculação também proporcionou efeito sistêmico, enquanto o efeito curativo foi descartado. Estudos posteriores mostraram que a ulvana não interfere com a germinação de *C. fructicola*, porém atrasa a formação do apressório e estimula o crescimento do tubo germinativo (ARAÚJO; GONÇALVES; STADNIK, 2014).

Em plantas de feijoeiro, o tratamento foliar com ulvana (10 mg.mL^{-1}) reduziu a antracnose em 38 % (PAULERT *et al.*, 2009) e a murcha de fusarium em 27 % (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). Por outro lado, o crescimento micelial e a germinação dos conídios de *C. lindemuthianum* foram estimulados em presença do polissacarídeo (PAULERT *et al.*, 2009). Similarmente, em plantas de *A. thaliana*, o polissacarídeo reduziu as doenças causadas por *Alternaria brassicicola* e *Colletotrichum higginsianum* independente do grau de sulfatação da ulvana (DE FREITAS *et al.*, 2015)

O efeito fungitóxico da ulvana foi descartado em diferentes estudos e o seu efeito na redução de doenças vegetais explicado pela indução de resistência (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; STADNIK, 2013; PAULERT *et al.*, 2007, 2009). Além disso, estudos desenvolvidos por Jaulneau *et al.* (2010) confirmaram que a ulvana induz expressão genética similar à observada na rota do metil-jasmonato. Adicionalmente, a atividade de enzimas relacionadas com a resistência (peroxidases) foi comprovada após o tratamento com o polissacarídeo em plantas de macieira (ARAÚJO; STADNIK, 2013).

2.4.2. Extratos fúngicos

Os fungos durante o seu desenvolvimento produzem moléculas como polissacarídeos, carboidratos, proteínas, lipídios e fenóis. Estas moléculas têm uma ampla gama de funções: estrutural, reserva energética, proteção das estruturas fúngicas, produção de antibióticos, geração de moléculas sinalizadoras para o estabelecimento da

comunicação com outros organismos, produção de compostos formadores de quelatos, entre outras (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2012; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006).

As moléculas fúngicas podem ser obtidas a partir de estruturas macroscópicas ou da biomassa micelial pelo uso de solventes. Os extratos fúngicos obtidos apresentam em média vida mais curta no ambiente e geralmente não apresentam toxidez quando comparados com os fungicidas. Porém, a comprovação *in vivo* da eficácia destas moléculas e o método de aplicação para o controle de doenças vegetais ainda devem ser estudados (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2012).

Os extratos fúngicos podem atuar como sinalizadores na defesa vegetal (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2012; VAN LOON; REP; PIETERSE, 2006). Viecelli *et al.* (2010) demonstraram redução da mancha angular de feijoeiro pelo uso do extrato aquoso do micélio de *Pycnoporus sanguineus*. As plantas tratadas também apresentaram aumento na atividade enzimática das peroxidases e das polifenoloxidasas e maior teor de proteínas e de clorofila, porém o tratamento apresentou efeito fungitóxico.

Os extratos aquosos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* também são conhecidos pelo seu potencial bioativo. Di Piero e Pascholati (2004) mostraram efeito local e sistêmico em plantas de pepino contra a antracnose. Além disso, os tecidos vegetais apresentaram acúmulo de peroxidases e quitinases, enquanto ensaios *in vitro* descartaram o efeito antifúngico dos extratos. Pelo contrário, o extrato de *A. blazei*, inibiu a germinação de uredósporos de *Puccinia recondita* f.sp. *tritici*, enquanto os extratos de *L. edodes* e *A. blazei* não apresentaram efeito fungitóxico *in vitro* sobre *Bipolaris sorokiniana* (FIORITUTIDA *et al.*, 2007).

Estudos recentes descrevem ao *C. fructicola* como a espécie dentro do seu gênero com o maior número de candidatos de fatores de virulência, tais como, enzimas degradadoras da parede celular, enzimas do ciclo biossintético dos metabólitos secundários e proteases, entre outras (LIANG *et al.*, 2018). Devido à ampla variedade de enzimas do metabolismo secundário descritas para *Colletotrichum* spp. se espera que esta espécie produza uma gama extraordinariamente grande e divergente de metabólitos secundários, alguns dos quais podem ser moléculas bioativas (O'CONNELL *et al.*, 2012). Além dos já conhecidos polissacarídeos estruturais, glucana e quitina, que compõem a parede celular dos fungos e cujo potencial para o controle de doenças vegetais tem sido descrito previamente (STACEY; SHIBUYA, 1997; WU *et al.*, 2005).

2.4.2.1. Glucosamina

A glucosamina é um monossacarídeo que compõe a estrutura de algumas moléculas como a quitina e a quitosana. A saber, a quitina é um polissacarídeo catiônico linear e junto com a quitosana são um dos maiores e mais importantes componentes da parede celular dos fungos. Além disso, a quitina é precursora direta da quitosana, a qual pode ser obtida pela desacetilação alcalina da quitina (ROBERTS, 1992; ZAMANI *et al.*, 2008, 2010).

Os tecidos vegetais contêm pouca ou nenhuma porcentagem de glucosamina. Contudo, as plantas possuem enzimas capazes de digerir polímeros de glucosamina e quitina: as β -glucanases e as quitinases, respectivamente. Assim, estas enzimas poderiam ter sido conservadas durante o processo evolutivo para resistir ao ataque por insetos e fungos (HADWIGER, 2013).

Nas últimas décadas, o uso da quitina e a quitosana vem crescendo para o controle e a indução de resistência vegetal contra fungos, bactérias, vírus e outros estresses abióticos. A aplicação foliar de quitosana resultou na redução de podridões pós-colheita em frutos de morangueiro (MAZARO *et al.*, 2008). Khan, Prithviraj e Smith (2003) demonstraram o aumento de enzimas relacionadas à defesa e do conteúdo total de fenóis em folhas de soja tratadas com quitina e quitosana. Além disso, uma maior e mais rápida resposta de resistência relacionada às mesmas enzimas foi confirmada em plantas de soja resistentes a *Phytophthora megasperma* (BHATTACHARYYA; WARD, 1988). Em macieira, quitinas e quitosanas derivadas de fungo reduziram as lesões causadas por *B. cinerea* e *P. expansum* (WU *et al.*, 2005). Assim, apesar da quitina e os seus derivados não controlar completamente os fitopatógenos alvos, estas moléculas podem ter um efeito bioativo nas plantas ou até atuar como elicitores na indução de resistência vegetal sem apresentar os típicos efeitos tóxicos, alérgicos ou carcinogênicos dos fungicidas (HADWIGER, 2013; STACEY; SHIBUYA, 1997).

Tradicionalmente, a quitina e a quitosana são obtidas do exoesqueleto de camarão e caranguejo como subprodutos da indústria de frutos do mar e utilizadas como adjuvantes em produtos agrícolas comerciais. Também as conchas de crustáceos, esqueletos de lulas e cutículas de insetos contêm quitina como o seu maior polissacarídeo estrutural (HADWIGER, 2013). No Brasil, a empresa BioSul Fertilizantes comercializa o Ativa[®], uma solução de glucosamina de origem orgânica e ação principal por contato, não tóxico e biodegradável. Em feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.), o Ativa[®] reduziu a incidência e

a severidade da antracnose, diminuiu também os danos causados pelo ataque de lagartas e apresentou outros benefícios agrônômicos secundários: maior número de vagens por planta e maior produção de biomassa. Também, este produto apresentou potencial na redução da MFG, do cancro e da sarna em macieira (ZANATA, 2017)¹. Além dos compostos bioativos de origem orgânica mencionados anteriormente, existem compostos de origem inorgânica que podem ser uma alternativa viável para o controle de patógenos vegetais (CWALINA-AMBROZIAK, 2012).

2.4.3. Fosfitos de potássio

O fosfito é um íon molecular que contém um átomo de fósforo e é a forma reduzida do fosfato. O uso deste composto como agrotóxico ou bioestimulante aumentou nas últimas décadas (FÖRSTER *et al.*, 1998; GÓMEZ-MERINO; TREJO-TÉLLEZ, 2015; KATSURAYAMA; BONETI, 2009). Em plantas de macieira, o tratamento curativo com fosfito de potássio reduziu em um 90 % a MFG. Os experimentos *in vitro* mostraram redução de até 94 % no crescimento micelial de *C. gloeosporioides* em presença do composto. Assim, o efeito curativo do fosfito foi atribuído a sua atividade antimicrobiana (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; VALDEBENITO-SANHUEZA; STADNIK, 2010). Por sua vez, plantas de pimentão (*Capsicum annuum* L.) cultivadas em sistemas hidropônicos com diferentes concentrações de fosfitos apresentaram consistentemente redução dos sintomas causados por *Phytophthora capsici* (FÖRSTER *et al.*, 1998). Similarmente, folhas de feijão fradinho em presença de fosfito apresentaram sintomas reduzidos da doença causada por *Phytophthora cryptogea* e maior síntese de fitoalexinas. As concentrações de fosfito utilizadas no estudo eram insuficientes para inibir o crescimento *in vitro* do fungo. Assim, o efeito deste composto foi explicado pela indução de resistência (SAINDRENAN *et al.*, 1988).

No controle de fitopatógenos, os efeitos dos fosfitos são mais evidentes quando são aplicados nas raízes em sistemas hidropônicos (FÖRSTER *et al.*, 1998) ou na forma de tratamentos foliares e é claro nas dosagens adequadas (GÓMEZ-MERINO; TREJO-TÉLLEZ, 2015). No Brasil, produtos à base de fosfitos são comercializados e recomendados para o controle de doenças vegetais. Por exemplo, Aminophito 40[®] é uma composição de 40 % de fósforo (P₂O₅), 20 % de potássio (K₂O) e aditivado com 10 % de aminoácidos (BIOSUL FERTILIZANTES, 2017a). Experimentos com Aminophito 40[®] foram

¹ Zanata, M. Biosul Fertilizantes. Vacaria-RS. Comunicação pessoal. 2017

desenvolvidos pela empresa de consultoria Proterra Engenharia Agronômica para o controle de *Venturia inaequalis* em macieira (VALDEBENITO, 2019)².

² Valdebenito, Rosa Maria. Proterra Engenharia Agronômica Ltda. Vacaria-RS. Comunicação pessoal. 2019

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. LOCALIZAÇÃO DA ÁREA EXPERIMENTAL

Os experimentos foram conduzidos durante os anos de 2017/18 no Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

O isolado *Colletotrichum fructicola* (MANE 147) proveniente de folhas de macieira com sintomas de MFG (VELHO *et al.*, 2015) foi mantido em meio batata dextrose ágar (BDA, Sigma-Aldrich, Brasil) e utilizado em todos os testes.

Sementes oriundas de frutos de macieira cv. Gala e polinizadora cv. Fuji foram germinadas em papel filtro umedecido com água destilada estéril (ADE) dentro de caixas gerbox e mantidas em geladeira por 50 dias a 5 °C no escuro para a quebra da dormência. Em seguida, as sementes germinadas que apresentavam radículas ≥ 2 cm foram transferidas para bandejas contendo substrato de turfa e cultivadas em condições de casa de vegetação. Plântulas com 3-4 folhas verdadeiras foram transplantadas em vasos plásticos individuais contendo 1 L de uma mistura de composto orgânico e solo argiloso (1:2, v.v⁻¹) e foram cultivadas até apresentarem 10-12 folhas expandidas (ARAÚJO; STADNIK, 2011).

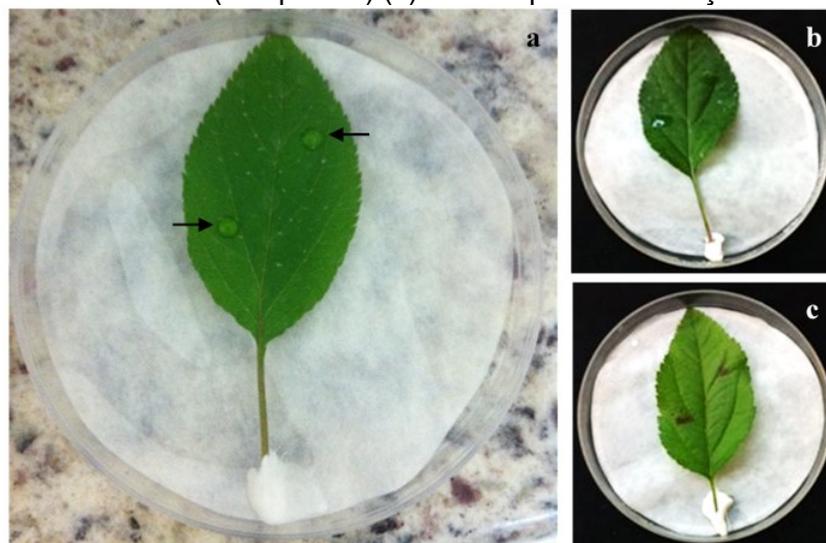
As plântulas foram irrigadas segundo as suas necessidades hídricas e fertilizadas no momento do transplante aos vasos plásticos com 10 mL de uma solução hidropônica (0,9 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, LabHidro, UFSC, Brasil). Oídio e pulgões foram controlados com aspersão de enxofre 80 % (3 g.L⁻¹, BASF) semanalmente e Actara 250 WG (1,2 g.L⁻¹, Sygenta) quando necessário, respectivamente (ARAÚJO; STADNIK, 2011).

3.3. SELEÇÃO DE GENÓTIPOS SEGREGANTES

Sendo que as sementes utilizadas provinham do cruzamento da cv. Gala x cv. Fuji, o genótipo das segregantes resistentes ou suscetíveis à MFG foi identificado de acordo com Araújo e Stadnik (2011). Para isto, a primeira folha completamente expandida de

plantas de 4 meses foi destacada. Em cada lado da folha foram depositados 10 μL de uma suspensão de conídios de *C. fructicola* numa concentração de 10^6 conídios. mL^{-1} (Figura 4). As folhas foram mantidas dentro de placas de Petri em condições de alta umidade a 26 °C e fotoperíodo de 12 horas. A incidência da MFG foi avaliada 8 dias após a inoculação e as plantas resistentes e suscetíveis foram detectadas pela ausência ou presença de sintomas, respectivamente (ARAÚJO *et al.*, 2008). As plantas suscetíveis de macieira foram escolhidas e utilizadas nos experimentos em casa de vegetação.

Figura 4 - Teste de seleção de segregantes. A primeira folha completamente expandida foi destacada, e duas gotas (setas) de uma suspensão de conídios de *Colletotrichum fructicola* (10^6 conídios. mL^{-1}) foram depositadas em cada lado da folha (a) para testar reações de resistência (incompatível) (b) ou suscetibilidade (compatível) (c) 8 dias após a inoculação.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

3.4. TRATAMENTOS

As folhas foram lavadas para eliminação do enxofre residual 24 horas antes do início dos experimentos. Posteriormente, as plantas todas foram aspergidas com os tratamentos (Tabela 1, Figura 5) até o ponto de escorrimento (≈ 6 mL por planta). Para tal, foi utilizada uma pistola acoplada a um moto compressor de ar (Preview Berry 1,5 L; Matabi).

As carragenanas (concentração 100 %) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os fertilizantes foliares, Reference[®], Ativa[®] e Aminophito 40[®] foram fornecidos pela Biosul Fertilizantes (Vacaria/Rio Grande do Sul, Brasil).

A ulvana foi obtida conforme metodologia adaptada de Paulert *et al.* (2009). Para tal, 300 g de alga fresca foram autoclavados por 2 horas a 110 °C em 1 L de ADE. A solução

aquosa resultante foi separada dos resíduos da alga em papel filtro Whatman n° 1 (retenção de partículas: 11 µm, Sigma-Aldrich, Brasil) por filtrações sucessivas em um funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo (Primastec, Brasil). Para a precipitação dos polissacarídeos foram adicionados 3 volumes de etanol (96° GL) por 48 horas a -20 °C. Finalmente, os polissacarídeos foram separados por filtração em papel filtro (como descrito anteriormente) e secos a 45 °C até peso constante e armazenados até seu uso.

Cultivos *in vitro* de *C. fructicola* foram feitos para a obtenção de extratos aquosos. Para tal, três discos de micélio (8 mm diâmetro) provenientes de colônias de 20 dias foram transferidos para Erlenmeyers contendo 100 mL de CBD (Kasvi, Brasil). Os cultivos foram mantidos em agitação constante a 120 rpm, 26 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 8 dias, o micélio foi separado em papel filtro Whatman n° 1 por filtração a vácuo em funil de Buchner. Em seguida, o micélio obtido foi seco a 45 °C em estufa até peso constante e pulverizado em moinho elétrico (MDR302, Cadence, Brasil). O filtrado líquido remanescente também foi mantido para posteriores metodologias (VIECELLI *et al.*, 2010).

No total, foram preparados dois tratamentos a partir do micélio seco e dois tratamentos a partir do filtrado líquido remanescente. Inicialmente, um extrato aquoso foi preparado através da diluição de 10 mg.mL⁻¹ do micélio em pó. Posteriormente, a metade da solução foi autoclavada (Aut.) por 20 minutos a 110 °C para a obtenção do tratamento micélio Aut. *C. fructicola* (Cf). A outra metade da solução não foi autoclavada e foi considerada como o tratamento micélio Cf. Similarmente, 50 mL do filtrado líquido remanescente foram autoclavados nas condições descritas anteriormente para a obtenção do tratamento CBD Aut. Cf., entanto que 50 mL não foram autoclavados e foram considerados o tratamento CBD Cf (Tabela 2).

Para os experimentos foram utilizadas duas testemunhas, uma composta por plantas aspergidas com água destilada estéril (ADE) e outra por plantas aspergidas com caldo batata dextrose (CBD) (Tabela 2).

Tabela 2 - Compostos bioativos testados para o controle da Mancha Foliar de *Glomerella* em plantas de macieira cv. Gala. Os tratamentos foram aspergidos até o ponto de escorrimento 3 dias antes da inoculação com *Colletotrichum fructicola*.

Tratamento ^a	Concentração	Referência
testemunha ADE	-	-
ulvana	10 mg.mL ⁻¹	(ARAÚJO <i>et al.</i> , 2008)
I-carragenana	1 mg.mL ⁻¹	(SANGHA <i>et al.</i> , 2010)
λ-carragenana	1 mg.mL ⁻¹	
testemunha CBD	CBD	-
CBD <i>Cf</i>	filtrado cru	(VIECELLI <i>et al.</i> , 2010)
CBD Aut. <i>Cf</i>	filtrado cru	
micélio <i>Cf</i>	10 mg.mL ⁻¹	
micélio Aut. <i>Cf</i>	10 mg.mL ⁻¹	
Reference [®]	1,75 mL.L ⁻¹	(BIOSUL FERTILIZANTES, 2017a)
Ativa [®]	1,75 mL.L ⁻¹	
Aminophito 40 [®]	1,75 mL.L ⁻¹	

^aCaldo batata dextrose (CBD) onde foi crescido *C. fructicola* (*Cf*) autoclavado (Aut.) ou não, e micélio seco de *Cf* autoclavado (Aut.) ou não.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

3.5. INOCULAÇÃO

Para a produção do inóculo, discos de 8 mm de colônias de *C. fructicola* de 20 dias foram transferidos para placas de Petri de 90 mm contendo BDA e mantidos a 26 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 20 dias, as colônias foram raspadas superficialmente e a suspensão de conídios foi ajustada a uma concentração final de 10⁶ conídios.mL⁻¹ com auxílio de uma câmara de Neubauer (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Três dias após os tratamentos, as plantas todas foram aspergidas com a suspensão de conídios até o ponto de escorrimento (item 3.4). As plantas inoculadas foram mantidas em câmara úmida por 48 horas no escuro, a 26 °C e umidade relativa próxima a 100 %.

Após esse período, as plantas retornaram às condições iniciais em casa de vegetação até a avaliação da doença (ARAÚJO *et al.*, 2008).

3.6. AVALIAÇÃO DA SEVERIDADE DA DOENÇA

Antes de receber os tratamentos, a primeira folha completamente desenvolvida de cada planta foi devidamente identificada com uma etiqueta no pecíolo e designada como a primeira folha.

Devido à alta severidade da doença, a avaliação da doença foi feita três dias após a inoculação (DAI). Para tal, foram avaliados dois grupos de folhas: superiores (da 1ª até a 4ª) e inferiores (da 5ª até a 8ª), devido à influência da idade da folha na suscetibilidade da doença (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAUJO; STADNIK, 2013). Foi estimada a severidade da MFG utilizando o software Quant[®] (v.1.0.2; Universidade Federal de Viçosa, 2002).

Para os fins deste trabalho, entenda-se severidade como a porcentagem de tecido foliar afetado pela doença (NUTTER; TENG; SHOKES, 1991): lesões avermelhadas e lesões necróticas (SUTTON; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1998).

3.7. CRESCIMENTO MICELIAL *IN VITRO*

O efeito direto da ulvana, ι-carragenana e Reference[®] foi testado *in vitro* pela técnica de crescimento micelial radial de *C. fructicola* em meio BDA (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Soluções estoques concentradas dos tratamentos foram preparadas em ADE e mantidas em agitação por 18 horas até completa dissolução. Após a autoclavagem do meio BDA, alíquotas dos tratamentos foram adicionados ao meio quando a temperatura estava em torno de 50 °C. Foram obtidas quatro concentrações de cada tratamento (¼ da concentração utilizada *in vivo*, ½ da concentração utilizada *in vivo*, a concentração utilizada *in vivo* e o dobro da concentração utilizada *in vivo*): 2,5;5; 10 e 20 mg.mL⁻¹ para a ulvana; 0,5; 1; 3 e 5 mg.mL⁻¹ para a ι-carragenana e 0,5; 1; 1,75 e 3,5 mL.L⁻¹ para o Reference[®].

Placas de Petri contendo apenas meio BDA foram utilizadas como testemunha. Ácido láctico (0,5 mL.L⁻¹, 25 %, CAQ, Brasil) foi adicionado em todos os tratamentos para impedir o crescimento bacteriano, obtendo um pH final de 6,5 (ARAÚJO *et al.*, 2008). Em seguida, 25 mL de meio foram dispensados em placas de Petri de 90 mm. Após o resfriamento, um disco de micélio (8 mm de diâmetro) foi transferido no centro de cada

placa. Os discos de micélio utilizados foram cortados da margem de colônias de *C. fructicola* de 20 dias com o auxílio de um furador estéril. As placas foram mantidas a 26 °C e fotoperíodo de 12 horas por 9 dias (ARAÚJO *et al.*, 2008).

O crescimento da colônia foi determinado pela medição de dois diâmetros perpendiculares aos 3, 5, 7 e 9 dias após a repicagem do fungo com o auxílio de um paquímetro digital (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Experimentos complementares foram realizados para avaliar o efeito dos compostos individuais presentes na formulação do Reference[®]. Assim, foram testados molibdato de sódio dihidratado (Vetec, Brasil), sulfato de manganês (Vetec, Brasil), sulfato de zinco heptahidratado (Vetec, Brasil) e uréia (Quimex, Brasil) na concentração de 8, 109, 320 e 238 mg.mL⁻¹, respectivamente (os cálculos foram baseados na concentração de 1,75 mL.L⁻¹ de Reference[®], ANEXO A). Seguindo a metodologia descrita previamente, o meio BDA foi suplementado com cada composto. Meio BDA suplementado com Reference[®] na concentração de 1,75 mL.L⁻¹ foi utilizado como testemunha positiva, enquanto meio BDA sem suplementar foi utilizado como testemunha negativa.

3.8. GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS *IN VITRO*

O efeito direto de diferentes concentrações de ulvana, ι- carragenana e Reference[®] (item 3.7) foi testado *in vitro* sobre a germinação dos conídios e a formação de apressórios, utilizando a técnica de membrana de celofane segundo Gonçalves e Stadnik (2012).

Tiras de celofane incolor (25 x 75 mm²) foram cortadas, lavadas com ADE e secas. Em seguida, cada tira foi assentada sobre uma lâmina microscópica. Inicialmente, foram depositadas três gotas de 10 µL de uma suspensão de conídios (2 x 10⁵ conídios.mL⁻¹) sobre a superfície da membrana e em seguida, 10 µL de cada tratamento foram depositados sobre a suspensão conidial. A testemunha consistiu em ADE.

O conjunto contendo a lâmina e a membrana de celofane foi incubado no interior de uma placa de Petri junto com papel filtro umedecido com 2 mL de ADE. As placas de Petri foram fechadas e incubadas no escuro a 26 °C e 100 % de umidade relativa. Após 8 horas, as lâminas microscópicas foram removidas da câmara úmida e 10 µL de uma solução de azul de lactofenol (ácido láctico, fenol, água destilada, 1:1:1, v/p/v) foram depositados sobre cada gota para a paralização da germinação e a visualização dos conídios e das estruturas pré-infectivas (GONÇALVES; STADNIK, 2012).

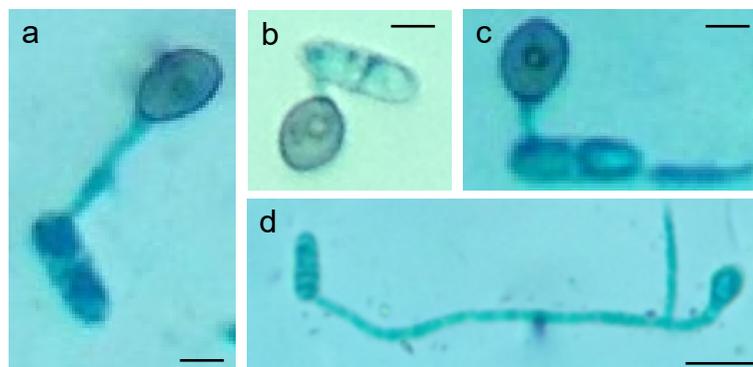
Para determinar a porcentagem de conídios germinados (CG), de conídios com um único apressório (CGA) e de conídios com um apressório e múltiplos tubos germinativos (CGM) avaliou-se microscopicamente 100 conídios por repetição (GONÇALVES; STADNIK, 2012). Para isto, conídios foram considerados germinados quando formaram um tubo germinativo maior que a largura do próprio conídio ou com apressório (Figura 6) (GONÇALVES; STADNIK, 2012). Além disso, para os conídios germinados foi calculado a porcentagem de conídios com múltiplos tubos germinativos (TGs), por outras palavras, conídios que apresentavam apressório e ≥ 1 TGs ou conídios com ≥ 2 TGs (Figura 6, c).

Os conídios germinados com apressório foram classificados em duas categorias de acordo com o comprimento do tubo germinativo (Figura 6): sésil ($\leq 10 \mu\text{m}$) ou pedicelado ($> 10 \mu\text{m}$) (ARAÚJO; GONÇALVES; STADNIK, 2014). Além disso, avaliou-se microscopicamente o comprimento do tubo germinativo dos apressórios pedicelados (CGAp) e a porcentagem de conídios com tubos germinativos ramificados (CGTR). Para tal, foram avaliados 50 conídios por repetição e três repetições por tratamento.

Conídios com TGs ramificados foram considerados quando apresentavam TG com hifas (Figura 6, d). Para os fins deste trabalho, TG foi considerado o crescimento filamentoso fino que não apresenta septo no seu ponto de origem no conídio (KURTZMAN *et al.*, 2011).

Todas as avaliações foram feitas utilizando um microscópio ótico (aumento 400x; Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

Figura 5 – Micrografias de luz da germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola*: conídio com apressório pedicelado ($> 10 \mu\text{m}$) (a), conídio com apressório sésil ($\leq 10 \mu\text{m}$) (b), conídio com múltiplos tubos germinativos (c) e conídio com tubo germinativo ramificado (d).



Barras: $5 \mu\text{m}$ (a-c), $15 \mu\text{m}$ (d).
Fonte: desenvolvido pelo autor.

3.9. DESENHO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os experimentos na casa de vegetação foram delineados em parcela subdividida utilizando sete repetições por tratamento. A unidade experimental foi composta por uma planta de macieira por vaso. t. As testemunhas (água e CBD) foram comparadas pelo teste t de Student ($P \leq 0,01$) e como a comparação não mostrou diferenças significativas os dados foram agrupados. O efeito de cada tratamento sobre a severidade da MFG foi comparado com a testemunha pelo teste t de Student ($P \leq 0,05$). Quando houve um aumento na severidade da doença, mas não significativa, foi assinado o valor de zero por cento (0 %) na redução da MFG.

Os experimentos *in vitro* do crescimento micelial e da germinação de conídios foram delineados em um desenho inteiramente casualizado (DIC), cada um composto por sete e cinco repetições, respectivamente. Uma placa de Petri representou cada unidade experimental.

A resposta de crescimento micelial de *C. fruticola* para os tratamentos foi ajustada ao modelo linear:

$$D_t = \lambda + \mu t \quad (1)$$

onde D_t é o diâmetro (mm) no tempo t ; t é o tempo em dias após a incubação; μ é a taxa de crescimento micelial (mm.dia^{-1}) e, λ é o diâmetro quando $t = 0$.

O efeito tanto das concentrações de cada tratamento, quanto dos compostos individuais de Reference[®] sobre a taxa de crescimento do fungo foi comparado pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

A porcentagem das categorias de conídios germinados foi estimada segundo a equação 2. Primeiramente, foi calculada a porcentagem de CG de cada repetição. Em seguida, considerando-se a porcentagem de CG em cada repetição igual a 100 %, a porcentagem de CGA e CGM foi calculada.

$$G(\%) = \frac{\text{número de conídios da categoria} \cdot 100}{\text{número total de conídios}} \quad (2)$$

A média de CG para cada tratamento foi ajustada ao modelo linear em função da concentração:

$$G_C = \lambda + \mu C \quad (3)$$

onde G_C é conídios germinados (%) na concentração C ; C é a concentração (mg.mL^{-1} ou mL.L^{-1}) do tratamento; μ é a taxa de germinação de conídios ($\%.\text{concentração}^{-1}$) e λ é a germinação quando $C = 0$.

As porcentagens de CGA e CGM para cada tratamento foram ajustadas a modelos não lineares.

As porcentagens de conídios com apressório séssil, conídios com apressório pedicelado, conídios com TG ramificado e o comprimento do TG do apressório pedicelado foram comparadas dentro de cada tratamento e a testemunha pelo teste de Tukey ($P \leq 0,05$).

Todos os experimentos foram realizados pelo menos duas vezes e os resultados foram expressos como a média deles. Todas as análises foram feitas utilizando o programa Statistica® (StartSoft, EUA).

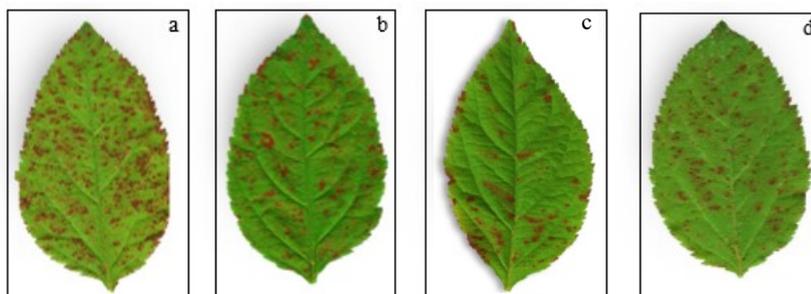
4. RESULTADOS

4.1. EFEITO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS NA SEVERIDADE DA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

Plantas testemunhas apresentaram severidade média da MFG de 11 e 26 % em folhas inferiores e superiores, respectivamente.

Nas folhas superiores, os tratamentos com Reference[®], ι- carragenana e ulvana reduziram a severidade da doença em 42, 42 e 31 %, respectivamente (Figura 7). Porém, nenhum tratamento foi significativo nas folhas inferiores (Tabela 3). Resultados individuais encontram-se em anexo (ANEXO C-G).

Figura 6 – Sintomas da Mancha Foliar de Glomerella causados por *Colletotrichum fructicola* em folhas superiores de macieira tratadas com água (a), ulvana (b), ι-carragenana (c) e Reference[®] (d) 3 dias após a inoculação.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

Tabela 3 - Efeito de compostos bioativos na severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum fructicola* em plantas de macieira (*Malus domestica* Borkh.) 3 dias após a inoculação.

Tratamento ^a	Redução da severidade da MFG	
	(% em relação à testemunha) ^b	
	Folhas inferiores	Folhas superiores
ulvana	32 ^{ns}	31*
ι-carragenana	7 ^{ns}	42*
λ-carragenana	4 ^{ns}	8 ^{ns}
CBD <i>Cf</i>	12 ^{ns}	9 ^{ns}
CBD Aut. <i>Cf</i>	28 ^{ns}	16 ^{ns}
micélio <i>Cf</i>	43 ^{ns}	15 ^{ns}
micélio Aut. <i>Cf</i>	0 ^{ns}	0 ^{ns}
Reference [®]	19 ^{ns}	42*
Ativa [®]	29 ^{ns}	3 ^{ns}
Aminophito 40 [®]	45 ^{ns}	0 ^{ns}
Testemunha (%)	11	26
CV (%)	43	36

^a Caldo batata dextrose (CBD) onde foi crescido *C. fructicola* (*Cf*) autoclavado (Aut.) ou não, e micélio seco de *Cf* autoclavado (Aut.) ou não.

^b Porcentagem de redução da Mancha Foliar de *Glomerella* obtida por cada tratamento em relação à testemunha, o asterisco indica diferença significativa, *ns* indica diferença não significativa segundo o teste t de Student ($P \leq 0,05$).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

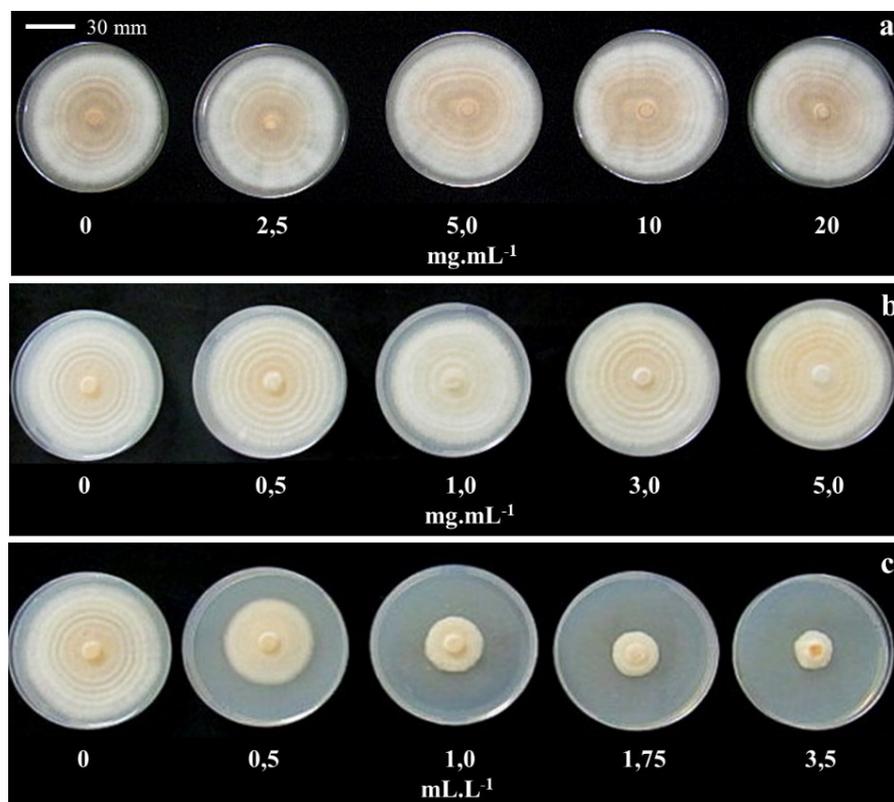
4.2. EFEITO NO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Colletotrichum fructicola*

A taxa de crescimento de *C. fructicola* foi de 8 mm.dia⁻¹ na testemunha. Ulvana e ι-carragenana não reduziram o crescimento de *C. fructicola*. Ao contrário, Reference[®] apresentou efeito dose- dependente e a redução da taxa de crescimento micelial variou de 50 até 87 % (Figura 8 e 9).

Nos experimentos complementares, Reference[®] e o sulfato de zinco reduziram em 88 e 94 % a taxa de crescimento de *C. fructicola*, respectivamente. Contudo, o molibdato

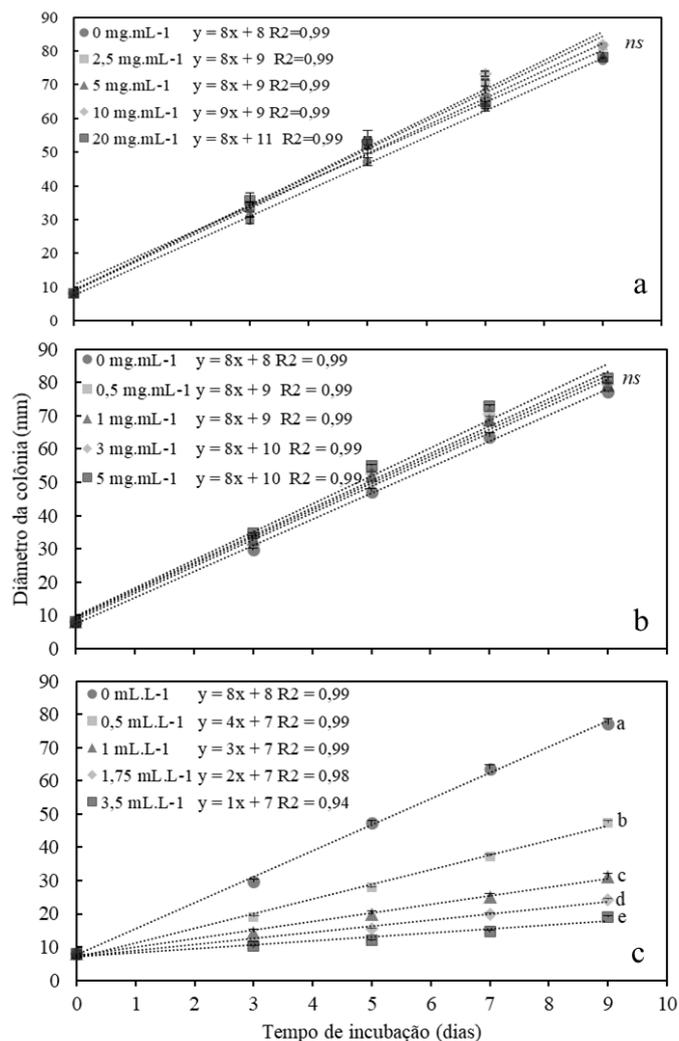
de sódio, o sulfato de manganês e a uréia não apresentaram efeito direto (Figura 10 e 11). Resultados individuais encontram-se em anexo (ANEXO H, I, M, N).

Figura 7 – Crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em meio BDA suplementado com ulvana (a), ι-carragenana (b) e Reference® (c) após 9 dias de incubação.



Fonte: desenvolvido pelo autor.

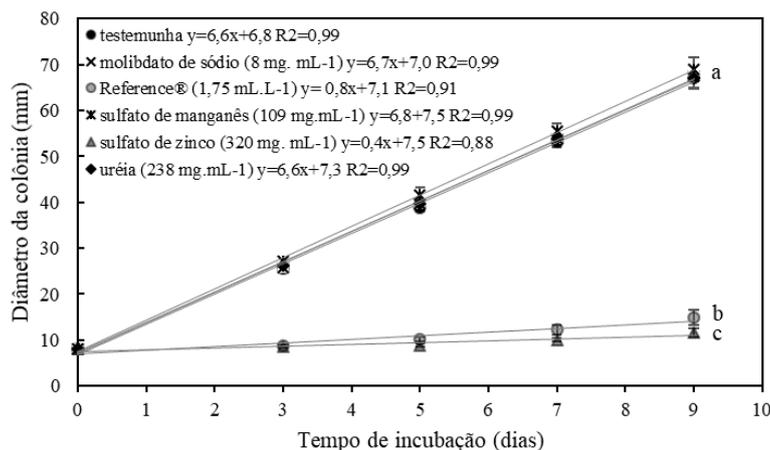
Figura 8 - Crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em função da concentração de ulvana (a), I- carragenana (b) e Reference® (c).



Valores representam a média ($n=14$) \pm DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos, *ns* indica diferença não significativa segundo o teste de Tukey ($P \leq 0,05$). Os dados correspondem à média de dois experimentos.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

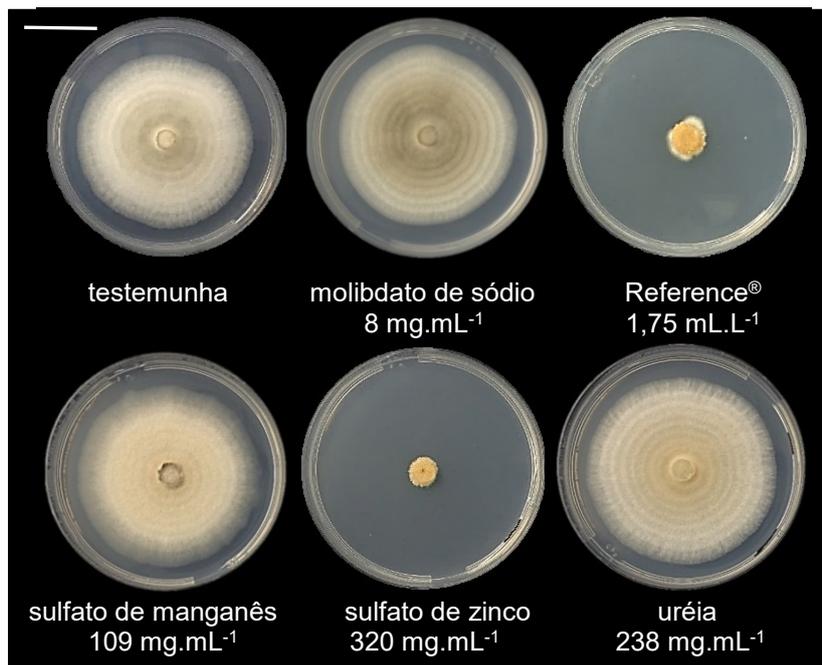
Figura 9 - Crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em presença de molibdato de sódio, sulfato de manganês, sulfato de zinco, uréia e Reference®.



Valores representam a média (n=10) ± DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre tratamentos segundo o teste de Tukey (P≤0,05). Os dados correspondem à média de dois experimentos.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Figura 10 – Crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em meio BDA suplementando com molibdato de sódio, Reference®, sulfato de manganês, sulfato de zinco e uréia após 9 dias de incubação.



Barra: 30 mm.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

4.3. EFEITO NA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E NA FORMAÇÃO DE APRESSÓRIOS

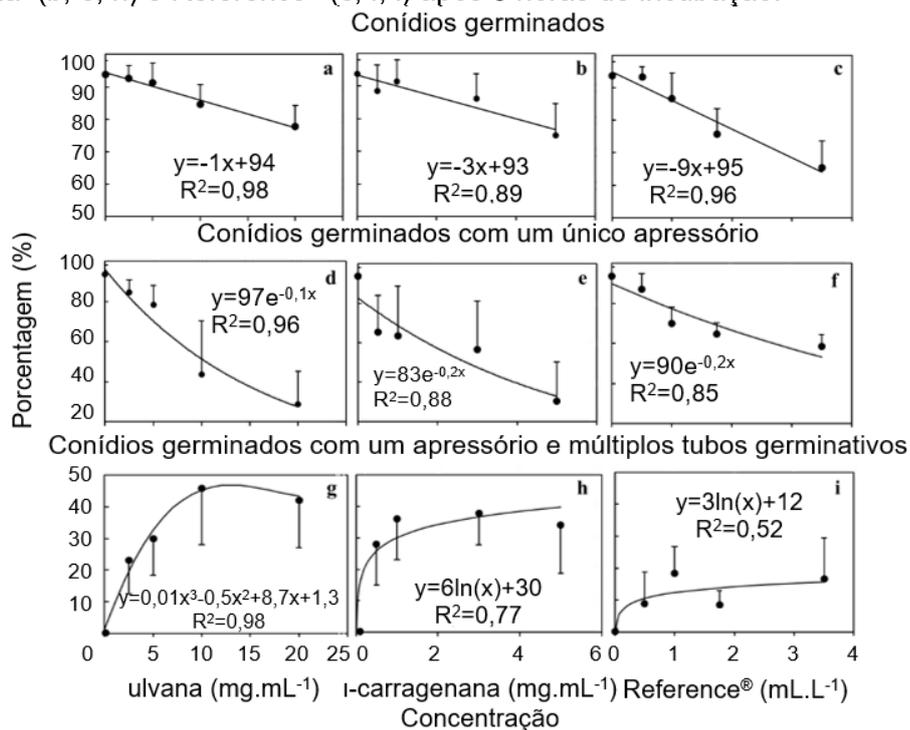
A porcentagem de conídios germinados na testemunha foi em torno de 94 % após 8 horas de incubação. Aproximadamente 92 % desses conídios formaram apressório séssil,

enquanto conídios com múltiplos tubos germinativos ou tubos germinativos ramificados foram escassos (Figura 12, Tabela 4).

As maiores concentrações de ulvana, *l*-carragenana e Reference® (20 mg.mL⁻¹, 5 mg.mL⁻¹ e 3,5 mL.L⁻¹, respectivamente) reduziram a germinação dos conídios em 17, 20 e 31 %, respectivamente (Figura 12, a-c). Além disso, os tratamentos reduziram o número de conídios com um único apressório em 69, 68 e 38 %, respectivamente (Figura 12, d-f). Ulvana, *l*-carragenana e Reference® aumentaram a porcentagem dos conídios com um apressório e múltiplos tubos germinativos em até 45, 37 e 17 %, respectivamente, a tendência foi para um acréscimo nas menores concentrações com uma posterior estabilização ou até diminuição nas maiores concentrações (Figura 12, g- i). Regressões e ajustes dos modelos lineares e não lineares encontram-se em anexo (ANEXO J-L).

Ulvana e *l*-carragenana estimularam a formação de apressórios pedicelados com tubos germinativos de maior comprimento e tubos germinativos ramificados. Cerca de 60 e 76 % dos conídios germinados apresentaram apressórios pedicelados nas maiores concentrações de ulvana (20 mg.mL⁻¹) e *l*-carragenana (5 mg.mL⁻¹), respectivamente. O comprimento do tubo germinativo destes conídios foi até 3 vezes maior na presença de ulvana e *l*-carragenana quando comparado com a testemunha (Tabela 4, Figura 13). Além disso, 5 e 8 % dos conídios germinados apresentaram tubos germinativos ramificados na presença de ulvana e *l*-carragenana, respectivamente (Tabela 4, Figura 13).

Figura 11 – Germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola* na presença de ulvana (a, d, g), ι-carragenana (b, e, h) e Reference® (c, f, i) após 8 horas de incubação.



Valores representam a média ($n=10$) \pm DP. Os dados correspondem a média de dois experimentos.
Fonte: desenvolvido pelo autor.

Tabela 4 – Porcentagem de apressório sésil ou pedicelado, de tubos germinativos ramificados e comprimento do tubo germinativo de *Colletotrichum fructicola* na presença de ulvana, i-carragenana e Reference® em membrana de celofane.

Tratamento	Variáveis				
	Concentração	apressório sésil (%)	apressório pedicelado (%)	comprimento tubo germinativo (μm) ^a	tubo germinativo ramificado (%) ^b
testemunha	-	92 a	8 a	7 a	0 a
ulvana	2,5 mg.mL ⁻¹	66 ab	34 a	14 a	1 b
	5 mg.mL ⁻¹	58 b	42 b	21 b	2 b
	10 mg.mL ⁻¹	44 b	56 b	22 b	5 b
	20 mg.mL ⁻¹	40 b	60 b	22 b	5 b
i-carragenana	0,5 mg.mL ⁻¹	70 a	30 a	13 a	5 b
	1 mg.mL ⁻¹	54 b	46 b	19 b	5 b
	3 mg.mL ⁻¹	32 b	68 b	26 b	8 b
	5 mg.mL ⁻¹	24 b	76 b	23 b	7 b
Reference®	0,5 mL.L ⁻¹	90 a	10 a	11 a	0 a
	1 mL.L ⁻¹	78 a	22 a	10 a	0 a
	1,75 mL.L ⁻¹	70 a	30 a	10 a	0 a
	3,5 mL.L ⁻¹	60 a	40 a	10 a	0 a
	CV (%)	39	63	49	129

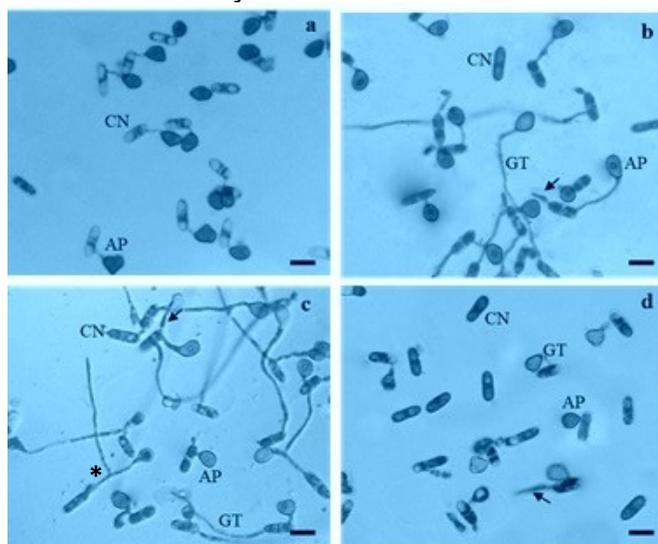
^a Média do comprimento do tubo germinativo do apressório pedicelado.

^b Média da porcentagem de conídios com presença de ramificações no tubo germinativo.

Valores representam a média (n=67) de dois experimentos. Para cada variável, médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem entre si pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$) dentro de cada tratamento e a testemunha.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

Figura 12 – Micrografias de luz da germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola* em membrana de celofane com água (a) e nas maiores concentrações de ulvana (b), ι- carragenana (c) e Reference® (d) após 8 horas de incubação.



Abreviaturas: Apressório (AP), tubo germinativo (GT), conídio (CN). As setas indicam presença de múltiplos tubos germinativos e o asterisco indica presença de tubos germinativos ramificados. Barras: 15 µm.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho mostrou que o Reference[®] apresenta efeito local nas folhas superiores de macieira e efeito direto sobre o desenvolvimento de *C. fructicola*. Menciona-se anteriormente que o Reference[®] contém extrato de *Ascophyllum nodosum*, e o extrato desta alga aplicado em folhas de cenoura reduziu a infecção causada por *Alternaria radicina* e *Botrytis cinerea* (JAYARAMAN *et al.*, 2008). Resultados similares foram reportados por Lizzi *et al.* (1998) em plantas de pimentão e videira infetadas com *Phytophthora capsici* e *Plasmopara viticola*. Contudo, o efeito antimicrobiano do extrato de *A. nodosum* não está documentado na literatura e o extrato de algas marrons, tais como, *S. fusiforme*, não inibiu o crescimento *in vitro* de *P. infestans*, nem de *B. cinerea* (SBAIHAT *et al.*, 2015).

Os macro e micronutrientes presentes em fertilizantes inorgânicos e orgânicos podem influenciar a incidência e a severidade de doenças e pragas (VEVERKA; ŠTOLCOVÁ; RŮŽEK, 2007). Micronutrientes, tais como o zinco, podem apresentar atividade antimicrobiana dose-dependente a partir de baixas concentrações e em condições *in vitro*. Savi, Bortoluzzi e Scussel (2013) mostraram que o sulfato de zinco (ZnSO₄, 16 ppm) inibiu completamente o crescimento micelial de *Fusarium graminearum* e *Penicillium citrinum*, enquanto o crescimento de *Aspergillus flavus* foi reduzido. Similarmente, ZnSO₄ (aprox. 20 ppm) inibiu totalmente o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* e outras espécies do gênero (CHATURVEDI, 1964; TANDON; CHANDRA, 1962). O efeito antimicrobiano dos macro e micronutrientes ainda não é bem esclarecido. Por um lado, as aplicações de fertilizantes em altas concentrações podem interferir diretamente com o metabolismo celular dos fungos, a morfologia das hifas, a esporulação, a germinação dos conídios ou aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (KUMAR; SINGH; JAISWAI, 2005; LÖFFLER *et al.*, 1986; SAVI; BORTOLUZZI; SCUSSEL, 2013). Por outro lado, em condições *in vivo*, estes compostos podem prejudicar o desenvolvimento dos fitopatógenos indiretamente pelo aumento da atividade dos organismos saprofitos (VEVERKA; ŠTOLCOVÁ; RŮŽEK, 2007). Uma vez que nos experimentos complementares o sulfato de zinco reduziu a taxa de crescimento micelial, a presença de zinco no Reference[®] poderia explicar o efeito fungistático observado sobre o crescimento micelial de *C. fructicola*.

A eficiência das carragenanas para o controle de fitopatógenos está relacionada com o seu grau de sulfatação (MERCIER *et al.*, 2001; SANGHA *et al.*, 2010). Em *A. thaliana*,

λ -carragenana (altamente sulfatada) induziu resistência contra *S. sclerotiorum*, enquanto ι -carragenana (menos sulfatada) aumentou a suscetibilidade à doença (SANGHA *et al.*, 2010). Em plantas de fumo, Vera *et al.* (2012) obtiveram redução significativa da doença causada por *Botrytis cinerea* após o tratamento com carragenanas com diferente grau de sulfatação. No entanto, as plantas apresentaram acúmulo diferenciado de compostos antimicrobianos dependendo do grau de sulfatação da carragenana. Contrariamente, λ e ι carragenana falharam no controle da murcha de fusarium em feijoeiro (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). Atualmente, o mecanismo de ação destes polissacarídeos não está esclarecido, e a resposta final pode estar relacionada com a especificidade nas interações eletrostáticas dos resíduos sulfatados do polissacarídeo com proteínas receptoras específicas na célula (POMIN, 2009). Assim, a falha no controle da MFG com λ -carragenana e o efeito local significativo de ι -carragenana no patossistema macieira-*C. fructicola* poderiam estar associados à especificidade na interação dos polissacarídeos.

Na dependência do grau de despolimerização, as carragenanas também mostram uma resposta diferencial de enzimas relacionadas com a defesa vegetal. Patier *et al.* (1995) demonstraram que as formas oligoméricas das carragenanas ou oligo-carragenanas (OCs) foram mais efetivas elicitando enzimas relacionadas à defesa em células de *Rubus fruticosus* L. quando comparadas com o polissacarídeo nativo. Em plantas de *Eucalyptus globulus*, o tratamento com OCs induziu níveis elevados de compostos com potencial atividade antimicrobiana (GONZÁLEZ; CONTRERAS; MOENNE, 2013). Assim, uma vez que neste trabalho foi testado apenas o polissacarídeo nativo, o estudo do efeito das OCs de ι -carragenana no patossistema macieira-*C. fructicola* seria interessante. Além disso, no melhor do nosso conhecimento, este é o primeiro relato de redução da MFG em macieira pelo uso de ι -carragenana.

A ulvana também tem apresentado consistentemente potencial para o controle de doenças vegetais. Plantas de feijoeiro tratadas com o polissacarídeo apresentaram menor severidade da antracnose (DE FREITAS; STADNIK, 2012) e da murcha de fusarium (DE BORBA; DE FREITAS; STADNIK, 2019). Resultados similares foram obtidos em plantas de *Medicago truncatula* infectadas por *Colletotrichum trifolii* (CLUZET *et al.*, 2004). Em macieira, Araújo *et al.* (2008) mostraram que o tratamento de ulvana 3 dias antes da inoculação pode reduzir localmente em 65 % a severidade da MFG nas folhas inferiores, sendo que o efeito local deste polissacarídeo nas folhas superiores de macieira e neste intervalo de tempo não tinha sido confirmado até o momento.

Os extratos e compostos algais são mais conhecidos pela indução de resistência a diferentes estresses bióticos e abióticos do que pelo efeito antimicrobiano (PAULERT *et al.*, 2007, 2009). Estudos mostraram que a ulvana não inibiu o crescimento de *Colletotrichum* spp., de fungos filamentosos, de leveduras, nem de bactérias (ARAÚJO *et al.*, 2008; PAULERT *et al.*, 2007, 2009). Similarmente, carragenanas com diferentes graus de sulfatação não apresentaram atividade antimicrobiana *in vitro* contra *S. sclerotiorum* (SANGHA *et al.*, 2010). Neste estudo, ulvana e ι- carragenana efetivamente não reduziram a taxa de crescimento micelial de *C. fructicola*. Porém, a germinação dos conídios foi reduzida por todos os tratamentos em uma relação dose- dependente.

Sabe-se que a germinação dos conídios é influenciada por diversas variáveis, tais como a disponibilidade de água, a temperatura, entre outras (MAGAN, 1988). Por exemplo, Dillard (1988) demonstrou que a adição de sacarose reduz em uma relação dose- dependente a germinação de *Colletotrichum coccodes*. Resultados similares foram reportados na literatura pela mudança do potencial osmótico do meio (MAGAN, 1988). Estudos mostraram que a mudança do potencial osmótico do meio diminuiu severamente a germinação dos conídios de *Verticillium lecanii* (CHANDLER; HEALE; GILLESPIE, 1994). Contudo, estudos prévios mostraram que a ulvana em uma concentração de 10 mg.mL⁻¹ pode proporcionar um leve efeito estimulante na germinação de *C. fructicola*, porém maiores concentrações não tinham sido testadas até agora (ARAÚJO; GONÇALVES; STADNIK, 2014; GONÇALVES; STADNIK, 2012). Assim, a redução dose- dependente observada na germinação dos conídios poderia ser explicada em parte pelas altas concentrações utilizadas, enquanto que o efeito local da ulvana e da ι- carragenana nas folhas jovens pela indução de resistência (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; STADNIK, 2013; DE FREITAS; STADNIK, 2012; PAULERT *et al.*, 2007).

Diversas fontes de carbono podem ser usadas pelo *Colletotrichum* spp. para o seu desenvolvimento e a sua esporulação. Apesar do efeito das carragenanas e do extrato de *A. nodosum* sobre a germinação de fungos patogênicos ser pouco estudado, Soares *et al.* (2016) mostraram que o tratamento com ι- carragenana gerava hifas encurtadas e altamente ramificadas no *Aspergillus* spp. Similarmente, o tratamento com ulvana estimulou tanto a formação quanto a alongação dos tubos germinativos e atrasou a diferenciação e a melanização dos apressórios de *C. fructicola* (GONÇALVES; STADNIK, 2012). Assim, polissacarídeos algais, tais como a ulvana, têm-se mostrado fontes de carbono eficientes para os fungos (PAULERT *et al.*, 2009). O estímulo na formação de múltiplos tubos germinativos. de *C. fructicola* após o tratamento como Reference[®],

I- carragenana e ulvana pode ser atribuído à eficiência do *Colletotrichum* spp. na utilização de monossacarídeos como fonte de carbono durante a germinação dos conídios (CHATURVEDI, 1964; GONÇALVES; STADNIK, 2012).

Nenhum tratamento reduziu significativamente a severidade da MFG nas folhas inferiores de macieira. Duas hipóteses podem ser levantadas para a explicação desses resultados: 1) Nenhum tratamento tem potencial para a redução da doença em folhas velhas. Sabe-se que para combater uma doença a planta deve primeiramente, reconhecer efetivamente ao patógeno através dos compostos por ele secretados ou gerados. Caso contrário, as reações de defesa podem ocorrer tarde demais, ser suprimidas ou não acontecer, resultando em um processo infeccioso exitoso (BOLLER, 1995). Embora ulvanas (ARAÚJO; STADNIK, 2013; JAULNEAU *et al.*, 2010), carragenanas (MERCIER *et al.*, 2001), fucoïdanas (KLARZYNSKI *et al.*, 2003), entre outras, têm apresentado potencial na indução de respostas de defesa, estudos comprovam que células vegetais reconhecem características estruturais específicas destas moléculas (CHEONG *et al.*, 1991; JAULNEAU *et al.*, 2010). Contudo, o efeito da ulvana foi previamente demonstrado neste nível foliar (ARAÚJO *et al.*, 2008). Assim, 2) esse conflito poderia ser explicado pela resistência ontogênica. Em macieira, as folhas mais velhas são menos suscetíveis à MFG quando comparadas com as folhas mais jovens (ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; STADNIK, 2013; ROCKENBACH *et al.*, 2018). Sabe-se que além de desempenhar um papel na proteção contra patógenos, a cutícula atua na difusão de moléculas, incluindo os elicitores de respostas de defesa (YEATS; ROSE, 2013). Bringe *et al.* (2006) observaram que as folhas jovens de macieira cv. Golden Delicious apresentam sulcos e protuberâncias microscópicas a diferencia das folhas velhas, sendo que estas modificações poderiam facilitar a interação com o meio externo. Assim, defesas constitutivas na cutícula das folhas velhas da macieira que poderiam protegê-las contra os patógenos também poderiam dificultar o reconhecimento dos compostos bioativos pelas células vegetais.

O controle químico tradicional gera uma redução de 30 até 92 % da severidade da MFG em macieira (ANEXO B). Assim, tratamentos químicos com redução superior a 72 % foram considerados alternativas eficientes e seguras para o controle da doença segundo Valdebenito-Sanhueza; Spadoa e Minuzzo (2018). Por sua vez, reduções da doença próximas a 46 % ou que apresentavam diferença significativa com a testemunha, proporcionaram controle intermediário (CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992). Além disso, uma redução na severidade da MFG tem o potencial de diminuir o desfolhamento precoce e manter a produtividade das plantas nos anos seguintes

(ARAÚJO *et al.*, 2008; ARAÚJO; STADNIK, 2013; CEREZINE; LEITE JR; TSUNETA, 1992). Portanto, pode-se dizer que Reference[®], I- carragenana e ulvana mostraram controle intermediário da MFG em condições de casa de vegetação. No entanto, estudos em campo devem ser conduzidos antes de dar por garantido o efeito destes tratamentos para o controle efetivo da MFG em macieira. Além disso, os resultados também indicam que o Reference[®] tem ação direta sobre o *Colletotrichum fructicola*, enquanto ulvana e I- carragenana atuam pela indução de resistência.

6. CONCLUSÕES

- Dentro dos 10 compostos bioativos testados, Reference[®], ι-carragenana e ulvana reduziram a severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* nas folhas superiores de macieira.
- Nenhum tratamento reduziu significativamente a Mancha Foliar de *Glomerella* nas folhas inferiores de macieira.
- Reference[®] apresentou efeito fungistático sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola*, enquanto ι-carragenana e ulvana não.
- Reference[®], ι-carragenana e ulvana apresentaram uma redução dose-dependente na germinação de conídios e estimularam a alongação e a formação de múltiplos tubos germinativos durante a germinação *in vitro* de *Colletotrichum fructicola*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, G. F. De *et al.* Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathology**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 78–82, 2008.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, A. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA) - Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relatório+PARA+2013-2015_VERSÃO-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>. Acesso em: 22 out. 2018.

ARAÚJO, L. *et al.* Sistema de alerta e previsões para o controle das doenças da macieira no estado de Santa Catarina. **Agropecuária Catarinense**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 86–91, 2019.

ARAÚJO, L. *et al.* Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 148–152, 2008.

ARAÚJO, L. *et al.* Podridão amarga e Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira : etiologia e manejo. In: **VII Simpósio Internacional de Fruticultura Temperada em Região Subtropical**. Avaré: Holantec, 2017.

ARAÚJO, L.; GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytoparasitica**, [s. l.], v. 42, p. 631–640, 2014.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. **Acta Scientiarum**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 287–293, 2013.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J. Infectious process and activity of enzymes in apple seedlings of genotype resistant or susceptible to *Glomerella* leaf spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 36, n. 4, p. 241–248, 2011.

ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; STADNIK, M. J. Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira. **Trans/Form/Ação**, [s. l.], v. 35, n. 1, p. 54–59, 2010.

BECKER, W. F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense**, [s. l.], v. 13, n. 3, p. 14–20, 2000.

BERTEAU, O.; MULLOY, B. Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 29–40, 2003.

BERTON, O. Avaliação Da Eficiência De Dithane E Cercap Com E Sem Agr'óleo No Controle Da Mancha Foliar Da Gala. **Agropecuária Catarinense**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 37–40, 2002.

BHATTACHARYYA, M. K.; WARD, E. W. B. Phenylalanine ammonia-lyase activity in soybean hypocotyls and leaves following infection with *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. **Canadian Journal of Botany**, [s. l.], v. 66, p. 18–23, 1988.

BIOSUL FERTILIZANTES. **Linha BioUp**. 2017a. Disponível em: <<http://www.biosul.com/linha/linha-bioup>>. Acesso em: 3 ago. 2017.

BIOSUL FERTILIZANTES. **Reference**. 2017b. Disponível em: <<http://www.biosul.com/produto/reference>>. Acesso em: 8 ago. 2017.

BOLLER, T. Chemoperception of Microbial Signals in Plant. **Annual Review of Plant Physiology**, [s. l.], v. 46, p. 189–214, 1995.

BONETI, J. I. S. *et al.* Evolução da cultura da macieira. In: BONETI, J. I. S. *et al.* (Eds.). **A cultura da macieira**. Florianópolis: Epagri, 2006. p. 743.

BONETI, J. I. S.; KATSURAYAMA, Y. Uso dos fosfitos e compostos naturais no controle das doenças da macieira. In: **Encontro nacional sobre fruticultura de clima temperado**. Fraiburgo, SC: Epagri, 2011. v. 1p. 54–66.

BOSCH, F. Van Den *et al.* Governing Principles Can Guide Fungicide-Resistance Management Tactics. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 52, p. 175–195, 2014.

BRINGE, K. *et al.* Ontogenetic variation in chemical and physical characteristics of adaxial apple leaf surfaces. **Phytochemistry**, [s. l.], v. 67, p. 161–170, 2006.

CASANOVA, L. *et al.* Sitios y estructuras de sobrevivencia de *Colletotrichum* spp., causante de la podredumbre amarga del manzano. **Agrociencia Uruguay**, [s. l.], v. 20, n. 2, p. 68–73, 2016.

CASANOVA, L. *et al.* First report of Glomerella leaf spot of apple caused by *Colletotrichum fructicola* in Uruguay. **Plant Disease**, [s. l.], v. 101, n. 5, p. 4–7, 2017.

CEREZINE, P. C.; LEITE JR, R. P.; TSUNETTA, M. Efeito de tratamentos químicos no controle da Mancha Foliar de Glomerella em macieira, no Estado do Paraná. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 258–267, 1992.

CHANDLER, D.; HEALE, J. B.; GILLESPIE, A. T. Effect of osmotic potential on the germination of conidia and colony growth of *Verticillium lecanii*. **Mycological Research**, [s. l.], v. 98, n. 4, p. 384–388, 1994.

CHATURVEDI, C. Nutritional studies on *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, [s. l.], v. 27, n. 3–4, p. 265–272, 1964.

CHEONG, J. *et al.* Structure-Activity Relationships of Oligo-B-glucoside Elicitor of Phytoalexin Accumulation in /Soybean. **The Plant Cell**, [s. l.], v. 3, n. February, p. 127–136, 1991.

CLUZET, S. *et al.* Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulva* spp. **Plant, Cell and Environment**, [s. l.], v. 27, p. 917–928, 2004.

CRUSIUS, L. U. *et al.* Epidemiology of Apple Leaf Spot. **Fitopatologia Brasileira**, [s. l.], v. 27, p. 65–70, 2002.

CWALINA-AMBROZIAK, B. The effect of foliar fertilizers on mycelial growth of select pathogenic fungi under in vitro conditions. **Polish Journal of Environmental Studies**, [s. l.], v. 21, p. 589-594, 2012.

DE BORBA, M. C.; DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Ulvan enhances seedling emergence and reduces Fusarium wilt severity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Crop Protection**, [s. l.], v. 118, p. 66–71, 2019.

DE FREITAS, M. B. *et al.* Ulvans induce resistance against plant pathogenic fungi independently of their sulfation degree. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 133, p. 384–390, 2015.

DE FREITAS, M. B.; STADNIK, M. J. Physiological and Molecular Plant Pathology Race-specific and ulvan-induced defense responses in bean (*Phaseolus vulgaris*) against *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 78, p. 8–13, 2012.

DE RUITER, G. A.; RUDOLPH, B. Carrageenan biotechnology. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. 389–395, 1997.

DI MARCO, S.; OSTI, F. Effect of biostimulant sprays on *Phaeomoniella chlamydospora* and esca proper infected vines under greenhouse and field conditions. **Phytopathology Mediterranea**, [s. l.], n. 48, p. 47–58, 2009.

DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Indução de resistência em plantas de pepino contra *Colletotrichum lagenarium* pela aplicação de extratos de basidiocarpos de *Lentinula edodes* e de *Agaricus blazei*. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 30, p. 243–250, 2004.

DILLARD, H. R. Influence of Temperature, pH, Osmotic Potential, and Fungicide Sensitivity on Germination of Conidia and Growth from Sclerotia of *Colletotrichum coccodes* in Vitro. **Phytopathology**, [s. l.], v. 78, n. 10, p. 1357–1361, 1988.

FIORI-TUTIDA, A. C. G. *et al.* Extratos de *Lentinula edodes* e *Agaricus blazei* sobre *Bipolaris sorokiniana* e *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, in vitro. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 113–118, 2007.

FOOD & AGRICULTURE ORGANIZATION STATISTICS DIVISION, F. **Apple production in 2017 Crops/World Regions/Production Quantity**. 2019. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>>. Acesso em: 16 fev. 2019.

FÖRSTER, H. *et al.* Effect of Phosphite on Tomato and Pepper Plants and on Susceptibility of Pepper to Phytophthora Root and Crown Rot in Hydroponic Culture. **Plant Disease**, [s. l.], v. 82, p. 1165–1170, 1998.

FRANCESCATTO, P. *et al.* Avaliação Fenológica das Diferentes Estruturas De Frutificação Das Macieiras “Gala” E “Fuji” Na Região De Caçador-Sc. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 37, n. 4, p. 913–923, 2015.

GÓMEZ-MERINO, F. C.; TREJO-TÉLLEZ, L. I. Biostimulant activity of phosphite in horticulture. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 196, p. 82–90, 2015.

GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. Interferência de ulvana no desenvolvimento e melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 431–437, 2012.

GONZÁLEZ, A.; CONTRERAS, R. A.; MOENNE, A. Oligo-Carrageenans Enhance Growth and Contents of Cellulose, Essential Oils and Polyphenolic Compounds in *Eucalyptus globulus* Trees. **Molecules**, [s. l.], v. 18, p. 8740–8751, 2013.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. First report of Glomerella leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the United States. **Plant Disease**, [s. l.], v. 83, n. 11, p. 1074, 1999.

GONZÁLEZ, E.; SUTTON, T. B. Population Diversity within Isolates of *Colletotrichum* spp. Causing Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apples in Three Orchards in North Carolina. **Plant Disease**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 1335–1340, 2004.

GRY, J. *et al.* EuroFIR-BASIS - a combined composition and biological activity database for bioactive compounds in plant-based foods. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 18, p. 434–444, 2007.

GUAADAQUI, A. *et al.* What is a Bioactive Compound? A Combined Definition for a Preliminary Consensus. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 174–179, 2014.

HADWIGER, L. A. Plant science review: Multiple effects of chitosan on plant systems: Solid science or hype. **Plant Science**, [s. l.], v. 208, p. 42–49, 2013.

HERNÁNDEZ, A. G.; MENDES, M. A. S. **Relatório de pragas e doenças**. 2018. Disponível em:

<http://bi.agricultura.gov.br/reports/rwservlet?agrofit_cons&pragas.rdf&p_id_foto=1602&p_script_body=&p_id_cultura_praga=4778¶mform=no>. Acesso em: 22 out. 2018.

INTEGRATED TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM, I. **Malus domestica Borkh.** 2018. Disponível em:

<https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=516655#null>. Acesso em: 27 nov. 2018.

JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Malus domestica Borkh.** 2018. Disponível em:

<<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB603011>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

JAULENEAU, V. *et al.* Ulvan, a sulfated polysaccharide from green algae, activates plant immunity through the jasmonic acid signaling pathway. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, [s. l.], v. 2010, n. June, p. 1–11, 2010.

JAYARAMAN, J. *et al.* Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. **Crop Protection**, [s. l.], v. 27, n. 10, p. 1360–1366, 2008.

JAYARAMAN, J.; NORRIE, J.; PUNJA, Z. K. Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 23, p. 353–361, 2011.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo das doenças de verão da macieira no Sul do Brasil. In: STADNIK, M. J. (Ed.). **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis: CCA-UFSC, 2009. p. 45–64.

KHAN, W. *et al.* Seaweed Extracts as Biostimulants of Plant Growth and Development. **Journal of Plant Growth Regulation**, [s. l.], v. 28, p. 386–399, 2009.

KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D. L. Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine-lyase activities in soybean leaves. **Journal of Plant Physiology**, [s. l.], v. 160, p. 859–863, 2003.

KLARZYNSKI, O. *et al.* Sulfated Fucan Oligosaccharides Elicit Defense Responses in Tobacco and Local and Systemic Resistance Against Tobacco Mosaic Virus. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 16, n. 2, p. 115–122, 2003.

KOWATA, L. S. *et al.* Glomerella leaf spot: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 40, n. 7, p. 1502–1508, 2010.

KUMAR, D.; SINGH, K. P.; JAISWAI, R. K. Effect of Fertilizers and Neem Cake Amendment in Soil on Spore Germination of *Arthrotrichum dactyloides*. **Mycobiology**, [s. l.], v. 33, n. 4, p. 194–199, 2005.

KURTZMAN, C. P. *et al.* Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. In: KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. (Eds.). **The Yeasts, a Taxonomic Study**. 5. ed. London: Elsevier B.V., 2011. p. 87–110.

LAHAYE, M.; ROBIC, A. Structure and function properties of Ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1765–1774, 2007.

LEITE JR, R. P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A. Y. Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná. **Instituto Agrônomo do Paraná**, [s. l.], v. 81, p. 6, 1988.

LIANG, X. *et al.* Transcriptomic analysis reveals candidate genes regulating development and host interactions of *Colletotrichum fructicola*. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 19, p. 557, 2018.

LIZZI, Y. *et al.* L'algue face au mildiou : quel avenir? **Phytoma**, [s. l.], v. 508, p. 29–30, 1998.

LÖFFLER, H. J. M. *et al.* Reduced chlamydospore formation and enhanced lysis of chlamydospores of *Fusarium oxysporum* in soil with added urea or ammonium chloride. **Biology and Fertility of Soils**, [s. l.], v. 2, p. 1–6, 1986.

LUDWIG, N. *et al.* Melanin Is Not Required for Turgor Generation but Enhances Cell-Wall Rigidity in Appressoria of the Corn Pathogen *Colletotrichum graminicola*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 315–327, 2014.

MAGAN, N. Effects of water potential and temperature on spore germination and germ-tube growth in vitro and on straw leaf sheaths. **Transactions of the British Mycological Society**, [s. l.], v. 90, n. 1, p. 97–107, 1988.

MAZARO, S. M. *et al.* Comportamento Pós-Colheita De Frutos De Morangueiro Após a Aplicação Pré-Colheita De Quitosana E Acibenzolar-S-Metil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 185–190, 2008.

MERCIER, L. *et al.* The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. **New Phytologist**, [s. l.], v. 149, n. 1, p. 43–51, 2001.

MING, P. **Annual Fresh Deciduous Fruit Report**. 2016. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/en/reports/annual-fresh-deciduous-fruit-report.pdf>>. Acesso em: 27 nov. 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: Freeman and Company, 2008.

NUTTER, F. W.; TENG, P. S.; SHOKES, F. M. Disease assessment terms and concepts. **Plant Disease**, [s. l.], v. 75, n. 11, p. 1187–1188, 1991.

O'CONNELL, R. J. *et al.* Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum fungi* deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 44, n. 9, p. 1060–1065, 2012.

O'ROURKE, D. World production, Trade, Consumption and Economic Outlook for Apples. In: FERREE, D. C.; WARRINGTON, I. J. (Eds.). **Apples: botany, production and uses**. United States of America: CAB International, 2003. p. 15–29.

PASCHOLATI, S. F.; LEITE, B. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: FILHO, A. B.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia Volume 1: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Editora Agrônoma Ceres Ltda, 1995. p. 417–452.

PATIER, P. *et al.* Free or silica-bound oligokappa-carrageenans elicit laminarinase activity in *Rubus* cells and protoplasts. **Plant Science**, [s. l.], v. 110, n. 1, p. 27–35, 1995.

PAULERT, R. *et al.* Antimicrobial properties of extracts from the green seaweed *Ulva fasciata* Delile. against pathogenic bacteria and fungi. **Algological Studies**, [s. l.], v. 123, p. 123–130, 2007.

PAULERT, R. *et al.* Effects of sulfated polysaccharide and alcoholic extracts from green seaweed *Ulva fasciata* on anthracnose severity and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Journal of Plant Disease and Protection**, [s. l.], v. 116, n. 6, p. 263–270, 2009.

PEREIRA-LORENZO, S.; RAMOS-CABRER, A. M.; FISCHER, M. Breeding Apple (*Malus x domestica* Borkh.). In: MOHAN JAIN, S.; PRIYADARSHAN, P. M. (Eds.). **Breeding Plantation Tree Crops: Temperate Species**. Finland: Springer Science, 2009. p. 33–81.

PÈRÉS, P. N. A new path. In: KIST, B. B. *et al.* (Ed.). **Brazilian Apple Yearbook 2018**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2018. p. 8.

- PETRI, J. L. *et al.* Advances of the apple crop in Brazil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 48–56, 2011.
- PETRI, J. L. Macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**, [s. l.], v. 30, n. 4, p. 857–1166, 2011.
- POMIN, V. H. An overview about the structure-function relationship of marine sulfated homopolysaccharides with regular chemical structures. **Biopolymers**, [s. l.], v. 91, n. 8, p. 601–609, 2009.
- POTTER, D. *et al.* and Evolution Phylogeny and classification of Rosaceae. **Plant Systematics and Evolution**, [s. l.], v. 266, p. 5–43, 2007.
- ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. 1. ed. London: The MacMillan Press LTD, 1992.
- ROCKENBACH, M. F. *et al.* Genetic Structure of *Colletotrichum fructicola* Associated to Apple Bitter Rot and Glomerella Leaf Spot in Southern Brazil and Uruguay. **Phytopathology**, [s. l.], v. 106, n. 7, p. 774–781, 2016.
- SAINDRENAN, P. *et al.* Effects of phosphite on phytoalexin accumulation in leaves of cowpea infected with *Phytophthora cryptogea*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 425–435, 1988.
- SANGHA, J. S. *et al.* Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 75, n. 1–2, p. 38–45, 2010.
- SAVI, G. D.; BORTOLUZZI, A. J.; SCUSSEL, V. M. **Antifungal properties of Zinc-compounds against toxigenic fungi and mycotoxin**, 2013.
- SBAIHAT, L. *et al.* Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. **Scientific World Journal**, [s. l.], v. 2015, p. 1–9, 2015.
- SCHWAN-ESTRADA, K. R. F. *et al.* Uso de extratos vegetais e cogumelos na indução de resistência de plantas a patógenos. In: RODRIGUES, F. de Á.; FORTUNATO, A. A.; RESENDE, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 9–28.
- SOARES, F. *et al.* Antifungal activity of carrageenan extracts from the red alga *Chondracanthus teedei* var. *lusitanicus*. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 28, n. 5, p. 2991–2998, 2016.
- STACEY, G.; SHIBUYA, N. Chitin recognition in rice and legumes. **Plant Soil**, [s. l.], v. 194, p. 161–169, 1997.
- STADNIK, M. J.; ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira. In: STADNIK, M. J. (Ed.). **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis: CCA-UFSC, 2009. p. 105–126.
- STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M. B. Polissacarídeos Algais: Fonte de indutores de

resistência de plantas. In: RODRIGUES, F. de Á.; FORTUNATO, A. A.; RESENDE, R. S. (Eds.). **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2012. p. 29–50.

STADNIK, M. J.; DE FREITAS, M. B. Algal polysaccharides as source of plant resistance inducers. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 111–118, 2014.

STADNIK, M. J.; PAULERT, R. Uso de macroalgas marinhas na agricultura. In: MONNÉ, M. A.; CARAMASCHI, U. (Eds.). **Anais do XI Congresso Brasileiro de Ficologia/Simpósio latino-americano sobre algas nocivas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Ficologia, 2008. p. 267–279.

SUTTON, T. B.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Necrotic leaf blotch of golden delicious-glomerella leaf spot: A resolution of common names. **Plant Disease**, [s. l.], v. 82, n. 3, p. 267–268, 1998.

TALAMINI, V.; STADNIK, M. J. Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK, M. J.; TALAMINI, V. (Eds.). **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. p. 45–62.

TANDON, R. N.; CHANDRA, S. The nutrition of *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. **Mycopathologia et Mycologia Applicata**, [s. l.], v. 18, n. 3, p. 213–224, 1962.

THE CANADIAN FOOD INSPECTION AGENCY'S PLANT AND BIOTECHNOLOGY RISK ASSESSMENT, P. **The biology of Malus domestica Borkh. (Apple)**. 2014. Disponível em: <<http://www.inspection.gc.ca/plants/plants-with-novel-traits/applicants/directive-94-08/biology-documents/malus-domestica/eng/1404417088821/1404417158789?chap=0#c4>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

USAPPLE ASSOCIATION. **2018 Annual Review**. 2018. Disponível em: <<http://usapple.org/wp-content/uploads/2018/11/2018AnnualReviewWeb.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2018.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. *et al.* Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã. **Circular técnica**, [s. l.], v. 36, p. 1–6, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. Doenças. In: NACHTIGALL, G. R. (Ed.). **Maçã: produção**. Brasília: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 116–134.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; SPADOA, A.; MINUZZO, P. S. Controle químico da Mancha de Glomerella (Complexo *Colletotrichum gloeosporioides*) em macieiras “Maxi Gala” em Vacaria, RS. In: SOUZA, Z. da S. (Ed.). **13º Seminário Nacional sobre Fruticultura de Clima Temperado Anais**. São Joaquim: Epagri, 2018. p. 71.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE, C. M. J. Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. **Annual Review of Phytopathology**, [s. l.], v. 44, p. 135–162, 2006.

VELHO, A. C. *et al.* New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 119, n. 4, p. 229–244, 2015.

- VELHO, A. C. *et al.* Modulation of oxidative responses by a virulent isolate of *Colletotrichum fructicola* in apple leaves. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 120, p. 1184–1193, 2016.
- VELHO, A. C.; STADNIK, M. J.; WALLHEAD, M. Unraveling *Colletotrichum* species associated with Glomerella leaf spot of apple. **Tropical Plant Pathology**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 197–204, 2019.
- VERA, J. *et al.* Oligo-carrageenans induce a long-term and broad-range protection against pathogens in tobacco plants (var. Xanthi). **Physiological and Molecular Plant Pathology**, [s. l.], v. 79, p. 31–39, 2012.
- VEVERKA, K.; ŠTOLCOVÁ, J.; RŮŽEK, P. Sensitivity of Fungi to Urea, ammonium nitrate and their equimolar solution UAN. **Plant Protection Science**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 157–164, 2007.
- VIECELLI, C. A. *et al.* Indução de resistência em feijoeiro a mancha angular por extratos de micélio de *Pycnoporus sanguineus*. **Summa Phytopathologica**, [s. l.], v. 36, n. 1, p. 73–80, 2010.
- VILLANI, S. **Preparing for Glomerella Leaf Spot and Fruit Rot in 2018**. 2018. Disponível em: <<https://apples.ces.ncsu.edu/2018/04/preparing-for-glomerella-leaf-spot-and-fruit-rot-in-2018/>>.
- VISSER, T. Pollen and pollination experiments IV 'mentor pollen' and 'pioneer pollen' techniques regarding incompatibility and incongruity in apple and pear. **Euphytica**, [s. l.], v. 30, p. 363–369, 1981.
- WANG, C.-X. *et al.* First report of Glomerella leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. **Plant Disease**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 912, 2012.
- WANG, Y. *et al.* The promotion of thiophanate-methyl and tebuconazole for the continuous control of Glomerella leaf spot in apple leaves by adding pellouxite as a synergistic reagent. **Journal of Plant Diseases and Protection**, [s. l.], v. 124, n. 6, p. 631–639, 2017.
- WU, T. *et al.* Physicochemical properties and bioactivity of fungal chitin and chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 53, p. 3888–3894, 2005.
- YEATS, T. H.; ROSE, J. K. C. The Formation and Function of Plant Cuticles. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 163, p. 5–20, 2013.
- ZAMANI, A. *et al.* Determination of Glucosamine and N-Acetyl Glucosamine in Fungal Cell Walls. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 56, p. 8314–8318, 2008.
- ZAMANI, A. *et al.* Temperature shifts for extraction and purification of Zygomycetes chitosan with dilute sulfuric acid. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 2976–2987, 2010.

ANEXO A - Características gerais dos produtos da Linha BioUp da empresa Biosul Fertilizantes.

Produto	Características	Dosagens recomendada
Ativa 40 [®]	Fertilizante mineral misto para aplicação via foliar. N: 1,0 % p/p (10 g.L ⁻¹) B: 0,2 % p/p (2 g.L ⁻¹) Densidade: 1 g.mL ⁻¹ Natureza Física: Flúido Suspensão: Homogênea Composição: Glucosamina modificada, uréia, ácido bórico, monoetanolamina, conservante, emulsionante e espessante tixotrópico.	1 mL.L ⁻¹
Aminophito 40 [®]	K ₂ O: 20 % p/p (290 g.L ⁻¹) Densidade: 1,45 g.mL ⁻¹ Natureza Física: Flúido Solução Verdadeira Composição: Fosfito de potássio (40 % de P ₂ O ₅ na forma de fosfito), aminoácidos naturais, conservante, emulsionante e espessante.	1,5 – 2 mL.L ⁻¹
Reference [®]	N: 5 % p/p (64 g.L ⁻¹) S: 3,1 % p/p (40 g.L ⁻¹) Mn: 2 % p/p (26 g.L ⁻¹) Mo: 0,2 % p/p (2.6 g.L ⁻¹) Zn: 4 % p/p (51 g.L ⁻¹) Densidade: 1,28 g.mL ⁻¹ Natureza Física: Flúido Suspensão: Heterogênea Composição: Uréia, molibdato de sódio, sulfato de manganês, sulfato de zinco, monoetanolamina, ácido cítrico, aminoácidos, extrato de algas , conservante, emulsionante e espessante.	1 mL.L ⁻¹

Fonte: Biosul Fertilizantes (2017b).

ANEXO B – Controle químico da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira.

Ingrediente ativo	Nome comercial	Tipo de tratamento	Redução da severidade da MFG (%)	Referência
Benomyl + Ziram	<i>nd</i>	C	68	(CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)
Captana	Orthocide 500®	P	79	(BONETI; KATSURAYAMA, 2011)
Clorotalonil + Ziram	<i>nd</i>	C	84-90	(CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)
Ditianona	<i>nd</i>	C	85	(CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)
Fosfito de potássio	Fitofos K plus®	P C	49-65 90	(ARAÚJO <i>et al.</i> , 2008; BONETI; KATSURAYAMA, 2011)
Hidróxido de cobre + Captana Hidróxido de cobre + Captana Oxicloreto de cobre + Captana	Supera®, Captan® Garra®, Captan® Cuprocarb®, Captan®	C	72-84	(VALDEBENITO-SANHUEZA; SPADOA; MINUZZO, 2018)
Iminoctadine	<i>nd</i>	C	73	(CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)
Mancozeb	Dithane NT® Dithane 800®	P C	50-89 86	(BERTON, 2002; BONETI; KATSURAYAMA, 2011; CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)
Mancozeb + Tebuconazole	<i>nd</i>	P	52	(KOWATA <i>et al.</i> , 2010)
Propineb	<i>nd</i>	P	30	(KOWATA <i>et al.</i> , 2010)
Tebuconazol	Sigma-Aldrich	P	30	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
Tiofanato metílico	Sigma-Aldrich	P	45	(WANG <i>et al.</i> , 2017)
Tiofanato metílico + Captana	Cercap®	P	41	(BERTON, 2002)
Tiofanato metílico + Mancozeb	<i>nd</i>	C	89	(CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)
Triadimefon + Mancozeb	<i>nd</i>	C	82-92	(CEREZINE; LEITE JR; TSUNETTA, 1992)

Abreviaturas: informação no disponível (*nd*).

Classificação tipo de tratamento: preventivo (P); curativo (C).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO C- Análises de variância em parcela subdividida ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a severidade (%) da Mancha Foliar de *Glomerella* aos 3 dias após a inoculação com *Colletotrichum fructicola* em plantas de macieira.

(continua)

ulvana; i-carragenana; λ-carragenana						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1*	Tratamento	419,6	3	139,9	11,7	0,0
	Erro	288,1	24	12,1		
	Posição	5952,6	1	5952,6	563,2	0,0
	T*P	292,3	3	97,4	9,2	0,0
	Erro	253,7	24	10,6		
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
2	Tratamento	400,1	3	133,4	2,0	0,1
	Erro	1581,5	24	65,9		
	Posição	930,9	1	930,9	58,1	0,0
	T*P	51,0	3	17,0	1,1	0,4
	Erro	384,6	24	16,0		
Ativa [®] , Aminophito 40 [®] ; Reference [®]						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1	Tratamento	551,9	3	184,0	2,6	0,1
	Erro	1761,5	24	73,4		
	Posição	6193,6	1	6193,6	305,4	0,0
	T*P	269,1	3	89,7	4,4	0,0
	Erro	486,7	24	20,3		
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
2	Tratamento	163,858	3	54,619	9,3	0,0
	Erro	141,037	24	5,877		
	Posição	91,775	1	91,775	47,4	0,0
	T*P	28,650	3	9,550	4,9	0,0
	Erro	46,429	24	1,935		
CBD Cf, CBD Aut. Cf; testemunha CBD						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1	Tratamento	65.3	3	21.8	0.7	0.6
	Erro	794.8	24	33.2		
	Posição	1299.8	1	1299.8	82.5	0.0
	T*P	16.9	3	5.6	0.4	0.8
	Erro	377.9	24	15.8		
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
2	Tratamento	155,9	3	52,0	0,8	0,5
	Erro	1500,4	24	62,5		
	Posição	6179,2	1	6179,2	263,4	0,0
	T*P	97,5	3	32,5	1,4	0,3
	Erro	563,1	24	23,5		

*Dados dos ensaios transformados para raiz (x). Abreviaturas: fontes de variação (FV); graus de liberdade (GL); soma dos quadrados (SQ); quadrado médio (QM); Valor do F-teste calculado (F); probabilidade de $F > F$ esperado (P).

ANEXO C - Análises de variância em parcela subdividida ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a severidade (%) da Mancha Foliar de *Glomerella* aos 3 dias após a inoculação com *Colletotrichum fructicola* em plantas de macieira.

(conclusão)

Micélio <i>Cf</i> ; micélio Aut. <i>Cf</i> ,						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1	Tratamento	31.300	31.300	31.300	31.300	0.246277
	Erro	185.784	185.784	185.784	185.784	
	Posição	34.132	1	34.132	10.2464	0.004952
	T*P	13.767	2	6.883	2.0664	0.155640
	Erro	59.960	18	3.331		
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
2	Tratamento	1639,40	2	819,70	9,3608	0,001634
	Erro	1576,20	18	87,57		
	Posição	7320,56	1	7320,56	290,7886	0,000000
	T*P	98,07	2	49,03	1,9478	0,171498
	Erro	453,15	18	25,17		
Reference®; ι-carragenana; micélio <i>Cf</i>						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1*	Tratamento	324,033	3	108,011	2,7394	0,065538
	Erro	946,286	24	39,429		
	Posição	3327,174	1	3327,174	81,9547	0,000000
	T*P	305,045	3	101,682	2,5046	0,083277
	Erro	974,346	24	40,598		
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
2	Tratamento	1833,73	3	611,24	7,2457	0,001260
	Erro	2024,63	24	84,36		
	Posição	3027,59	1	3027,59	72,3538	0,000000
	T*P	426,18	3	142,06	3,3949	0,034199
	Erro	1004,26	24	41,84		

*Dados dos ensaios transformados para raiz (x). Abreviaturas: fontes de variação (FV); graus de liberdade (GL); soma dos quadrados (SQ); quadrado médio (QM); Valor do F-teste calculado (F); probabilidade de $F > F$ esperado (P).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO D - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para a severidade da Mancha Foliar de Gala em plantas de macieira tratadas com compostos bioativos.

(continua)

Ensaio 1 de ulvana; ι-carragenana; λ-carragenana			
Posição folhas	Tratamento	Média	Teste Tukey
Superior	ι-carragenana	27,3	a
	testemunha	24,2	a
	λ-carragenana	25,2	a
	ulvana	14,3	b
Inferior	ι-carragenana	8,0	a
	testemunha	6,3	a
	λ-carragenana	3,0	ab
	ulvana	1,5	b
Ensaio 1 de Ativa [®] , Aminophito 40 [®] , Reference [®]			
Superior	Reference [®]	37,7	a
	testemunha	29,3	ab
	Aminophito 40 [®]	33,2	ab
	Ativa [®]	25,1	b
Inferior	Reference [®]	14,3	ns
	testemunha	10,5	
	Aminophito 40 [®]	6,4	
	Ativa [®]	9,9	
Ensaio 2 de Ativa [®] , Aminophito 40 [®] , Reference [®]			
Superior	testemunha	9,8	a
	Ativa [®]	7,3	a
	Aminophito 40 [®]	6,7	a
	Reference [®]	3,2	b
Inferior	testemunha	5,4	ns
	Ativa [®]	5,1	
	Aminophito 40 [®]	3,6	
	Reference [®]	2,7	
Ensaio 2 de Micélio <i>Cf</i> ; micélio Aut. <i>Cf</i>			
Superior	testemunha	43,2	a
	micélio Aut. <i>Cf</i>	47,1	a
	micélio <i>Cf</i>	29,5	b
Inferior	testemunha	17,7	ns
	micélio Aut. <i>Cf</i>	16,6	
	micélio <i>Cf</i>	6,3	

Letras diferentes indicam diferença significativa dos tratamentos dentro da mesma posição de folhas (superior ou inferior) de acordo com o teste realizado. ns: não significativo.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO D - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para a severidade da Mancha Foliar de Gala em plantas de macieira tratadas com compostos bioativos.
(conclusão)

Ensaio 2 de Reference [®] ; I-carragenana; micélio <i>Cf</i>			
Superior	testemunha	35,4	a
	micélio <i>Cf</i>	22,3	ab
	Reference [®]	21,1	b
	I-carragenana	11,8	b
Inferior	testemunha	13,4	ns
	micélio <i>Cf</i>	6,0	
	Reference [®]	7,1	
	I-carragenana	5,2	
Ensaio 1 de Reference [®] ; I-carragenana; micélio <i>Cf</i>			
Superior	testemunha	20,2	a
	micélio <i>Cf</i>	20,7	a
	I-carragenana	15,2	ab
	Reference [®]	9,0	b
Inferior	testemunha	0,8	ns
	micélio <i>Cf</i>	0,5	
	I-carragenana	0,3	
	Reference [®]	1,8	

Letras diferentes indicam diferença significativa dos tratamentos dentro da mesma posição de folhas (superior ou inferior) de acordo com o teste realizado. ns: não significativo.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO E - Teste t ($P \leq 0,01$) para a severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* nas testemunhas (água, meio CBD) aos 3 dias após a inoculação com *Colletotrichum fructicola* em folhas superiores e inferiores de plantas de macieira.

Folhas superiores			
Testemunha	Média	Teste t	P
Água	24,22	a	0,13
Meio CBD	28,98	a	
Folhas inferiores			
Testemunha	Média	Teste t	P
Água	7,46	a	0,05
Meio CBD	13,37	a	

Abreviaturas: Probabilidade de $F_c > F$ esperado. Letras iguais indicam diferença não significativa de acordo com o teste realizado.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO F - Teste t ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a porcentagem da severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* aos 3 dias após a inoculação com *Colletotrichum fructicola* em folhas superiores de plantas de macieira.

Tratamento	Média	Teste t	P
testemunha ulvana	26,0 17,9	a b	0,001948
testemunha I-carragenana	26,0 15,2	a b	0,021113
testemunha λ -carragenana	26,0 23,9	<i>ns</i>	0,357761
testemunha CBD <i>Cf</i>	26,0 23,7	<i>ns</i>	0,419134
testemunha CBD Aut. <i>Cf</i>	26,0 21,9	<i>ns</i>	0,177185
testemunha micélio <i>Cf</i>	26,0 22,2	<i>ns</i>	0,443287
testemunha micélio Aut. <i>Cf</i>	26,0 30,1	<i>ns</i>	0,090671
testemunha Reference [®]	26,0 15,0	a b	0,003013
testemunha Ativa [®]	26,0 25,14	<i>ns</i>	0,175738
testemunha Aminophito 40 [®]	26,0 33,2	<i>ns</i>	0,123397

Abreviaturas: Probabilidade de $F_c > F$ esperado. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado. *ns*: não significativo.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO G - Teste t ($P \leq 0,05$) para o efeito dos compostos bioativos sobre a porcentagem da severidade da Mancha Foliar de *Glomerella* aos 3 dias após a inoculação com *Colletotrichum fructicola* em folhas inferiores de plantas de macieira.

Tratamento	Média	Teste t	P
testemunha Ulvana	10,5 7,1	<i>ns</i>	0,175738
testemunha I-carragenana	10,5 9,8	<i>ns</i>	0,824329
testemunha λ -carragenana	10,5 10,1	<i>ns</i>	0,905311
testemunha CBD <i>Cf</i>	10,5 9,2	<i>ns</i>	0,588434
testemunha CBD Aut. <i>Cf</i>	10,5 7,6	<i>ns</i>	0,278140
testemunha micélio <i>Cf</i>	10,5 6,0	<i>ns</i>	0,079070
testemunha micélio Aut. <i>Cf</i>	10,5 13,1	<i>ns</i>	0,285462
testemunha Reference [®]	10,5 8,5	<i>ns</i>	0,429171
testemunha Ativa [®]	10,5 7,5	<i>ns</i>	0,242567
testemunha Aminophito 40 [®]	10,5 5,8	<i>ns</i>	0,106297

Abreviaturas: Probabilidade de $F_c > F$ esperado. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO H - Análise de variância ($P \leq 0,05$) para a taxa de crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em médio BDA suplementado com Reference®, I- carragenana e ulvana.

ulvana						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1	Concentração	0,634	4	0,159	0,529	0,7153
	Erro	8,994	30	0,300		
2	Concentração	0,895	4	0,224	0,615	0,6554
	Erro	10,920	30	0,364		
1+2	Concentração	0,606	4	0,152	0,47	0,7565
	Erro	20,902	65	0,322		
I-carragenana						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1	Concentração	5,091	4	1,273	1,024	0,410
	Erro	37,294	30	1,243		
2	Concentração	0,844	4	0,211	0,151	0,960
	Erro	41,891	30	1,396		
1+2	Concentração	0,150	4	0,038	0,12	0,9751
	Erro	20,510	65	0,316		
Reference®						
Ensaio	FV	SQ	GL	QM	F	P
1	Concentração	748,417	4	187,104	937,31	0,000
	Erro	5,989	30	0,2		
2*	Concentração	185,1893	4	46,2973	1264,03	0,000
	Erro	1,0988	30	0,0366		
1+2*	Concentração	23,0301	4	5,7575	1170,92	0,000
	Erro	0,3196	65	0,0049		

*Dados dos ensaios transformados para raiz (x). Abreviaturas: fontes de variação (FV); graus de liberdade (GL); soma dos quadrados (SQ); quadrado médio (QM); Valor do F-teste calculado (F); probabilidade de $F > F$ esperado (P).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO I - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para o efeito de Reference® na taxa de crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em meio BDA suplementado.

Ensaio	Concentração	Média	Teste Tukey	P
1	0	8,0	a	0,000135
	0,5	4,9	b	0,000135
	1	2,8	c	0,000135
	1,75	2,2	d	0,000137
	3,5	1,7	e	0,000183
2	0	7,9	a	0,000135
	0,5	4,6	b	0,000135
	1	2,7	c	0,000140
	1,75	2,0	d	0,000140
	3,5	1,3	e	0,000135
1+2	0	7,9	a	0,000127
	0,5	4,7	b	0,000127
	1	2,8	c	0,000127
	1,75	2,1	d	0,000127
	3,5	1,5	e	0,000127

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO J - Análise de variância ($P \leq 0,05$) para a regressão linear da porcentagem de germinação de conídios de *Colletotrichum fructicola* em presença de Reference®, I- carragenana e ulvana.

Reference®						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	5741,2	5741,2	125,670	0,000000	0,96
Erro	48	2192,8	45,7			
I-carragenana						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	1919,6	1919,6	33,708	0,000000	0,89
Erro	48	2733,4	56,9			
ulvana						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	1780,8	1780,8	61,579	0,000000	0,98
Erro	48	1388,1	28,9			

Abreviaturas: fontes de variação (FV); graus de liberdade (GL); soma dos quadrados (SQ); quadrado médio (QM); Valor do F-teste calculado (F); probabilidade de $F > F$ esperado (P), Coeficiente de determinação (R²).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO K – Estimativa dos parâmetros ($P \leq 0,05$) para a regressão da porcentagem de germinação de conídios com um único apressório de *Colletotrichum fructicola* em presença de Reference[®], i-carragenana e ulvana.

Reference [®]							
Modelo: $y=b*Exp^{(a*x)}$							
Parâmetro	Valor	Erro-padrão	t	IC (-95%)	IC (+95%)	P	R ²
a	-0,15058	0,01540	-9,77629	-0,18155	-0,11961	0,00000	0,85
b	90,12308	1,91681	47,01716	86,26907	93,97709	0,00000	
i-carragenana							
Modelo: $y=b*Exp^{(a*x)}$							
Parâmetro	Valor	Erro-padrão	t	IC (-95%)	IC (+95%)	P	R ²
a	-0,18403	0,03618	-5,08585	-0,25679	-0,11128	0,00001	0,88
b	83,17036	4,81108	17,28726	73,49704	92,84368	0,00000	
ulvana							
Modelo: $y=b*Exp^{(a*x)}$							
Parâmetro	Valor	Erro-padrão	t	IC (-95%)	IC (+95%)	P	R ²
a	-0,06352	0,00731	-8,68916	-0,07821	-0,04882	0,00000	0,96
b	96,9687	3,8519	25,1741	89,2239	104,7135	0,00000	

Abreviaturas: Valor de t calculado (t); Intervalo de Confiança (IC); probabilidade de t calculado > t esperado (P), Coeficiente de determinação (R²).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO L - Estimativa dos parâmetros ($P \leq 0,05$) para a regressão da porcentagem de germinação de conídios com um único apressório e múltiplos tubos germinativos de *Colletotrichum fructicola* em presença de Reference[®], i-carragenana e ulvana.

Reference [®]							
Modelo: $y=a+b*\text{Log}(x)$							
Parâmetro	Valor	Erro-padrão	t	IC (-95%)	IC (+95%)	P	R ²
a	12,41415	1,33462	9,30164	9,73072	15,09758	0,00000	0,52
b	2,602092	0,614691	4,233173	1,366174	3,838011	0,000103	
i-carragenana							
Modelo: $y=a+b*\text{Log}(x)$							
Parâmetro	Valor	Erro-padrão	t	IC (-95%)	IC (+95%)	P	R ²
a	30,31674	1,72590	17,56573	26,84658	33,78690	0,00000	0,77
b	6,034849	0,764463	7,894233	4,497793	7,571905	0,000000	
ulvana							
Modelo: $y=(a*x^3)+(b*x^2)+(c*x)+d$							
Parâmetro	Valor	Erro-padrão	t	IC (-95%)	IC (+95%)	P	R ²
a	0,009890	0,001962	5,039977	0,005940	0,013839	0,000008	0,98
b	-0,53076	0,05682	-9,34073	-0,64513	-0,41638	0,00000	
c	8,69458	0,39327	22,10842	7,90297	9,48620	0,00000	
d	1,3441	0,631861	2,127256	0,072260	2,615999	0,038792	

Abreviaturas: Valor de t calculado (t); Intervalo de Confiança (IC); probabilidade de t calculado > t esperado (P), Coeficiente de determinação (R²).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO M - Análise de variância ($P \leq 0,05$) para a regressão linear do crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em presença de Reference® e o seus compostos individuais.

controle						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	21289,9	21289,9	9639,1	0,00	0,99
Erro	48	106,0	2,2			
molibdato de sódio						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	21673,8	21673,8	15730,7	0,00	0,99
Erro	48	66,1	1,4			
Reference®						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	286,3	286,3	217,0	0,00	0,91
Erro	48	63,3	1,3			
sulfato de manganês						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	22776,1	22776,1	9211,0	0,00	0,99
Erro	48	118,7	2,5			
sulfato de zinco						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	72,9	72,9	180,5	0,00	0,88
Erro	48	19,4	0,4			
uréia						
FV	GL	SQ	QM	F	P	R ²
Concentração	1	21349,5	21349,5	10430,7	0,00	0,99
Erro	48	98,3	2,1			

Abreviaturas: fontes de variação (FV); graus de liberdade (GL); soma dos quadrados (SQ); quadrado médio (QM); Valor do F-teste calculado (F); probabilidade de $F > F$ esperado (P), Coeficiente de determinação (R²).

Fonte: desenvolvido pelo autor.

ANEXO N - Teste de separação de médias Tukey ($P \leq 0,05$) para o efeito de Reference® e seus compostos individuais na taxa de crescimento micelial de *Colletotrichum fructicola* em meio BDA suplementado.

Ensaio	Composto	Média	Teste Tukey	P
1	sulfato de manganês	7,0	a	0,002329
	molibdato de sódio	6,6	b	0,979295
	uréia	6,5	b	1,000000
	testemunha	6,5	b	1,000000
	Reference®	0,8	c	0,000138
	sulfato de zinco	0,3	d	0,000138
2	sulfato de manganês	6,7	a	0,998978
	molibdato de sódio	6,7	a	0,999967
	uréia	6,7	a	0,999967
	testemunha	6,7	a	1,000000
	Reference®	0,8	b	0,000138
	sulfato de zinco	0,4	b	0,000138
1+2	sulfato de manganês	6,8	a	0,528708
	molibdato de sódio	6,7	a	0,998961
	uréia	6,7	a	1,000000
	testemunha	6,6	a	1,000000
	Reference®	0,8	b	0,000138
	sulfato de zinco	0,4	c	0,000138

Fonte: desenvolvido pelo autor.