

Leonardo Araujo

Mecanismos de resistência inata e induzida por ulvana à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., agente causal da Mancha Foliar de Glomerella em macieira (*Malus domestica* Borkh.)

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik

Florianópolis, 2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

A663m Araujo, Leonardo

Mecanismos de resistência inata e induzida por ulvana à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., agente causal da Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira (*Malus domestica* Borkh.) [dissertação] / Leonardo Araujo ; orientador, Marciel João Stadnik. Florianópolis, SC, 2010.

74 p.: il., graf., tabs.

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

Inclui referências

1. Recursos genéticos vegetais. 2. Maçã. 3. *Colletotrichum gloeosporioides*. 4. Ulva fasciata. 5. Mancha foliar de glomerella. 6. Algas verde. I. Stadnik, Marciel Joao. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

CDU 631

DEDICO

Aos meus pais, Valmir e Elizabete pela afeição, educação, incentivo e apoio para realização deste trabalho. Sinto orgulho em afirmar que os amo muito e que eles foram os principais responsáveis para que eu alcançasse meus objetivos;

A minha querida avó Egidia pela ternura e carinho incondicional;

A minha esposa Kamila e filha Ana Beatriz pelo amor e compreensão nos momentos de ausência;

A Deus.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Professor Marciel João Stadnik, pelos ensinamentos, orientação, incentivo e auxílio em todas as etapas do trabalho;

Aos Professores do Curso, pelo estímulo e ensinamentos;

A Dra. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza, pelo apoio e conselhos oferecidos;

Ao Programa Iberoamericano de Ciência e Tecnologia para o Desenvolvimento (CYTED) pela oportunidade de conhecer culturas e países diferentes;

A todos do Centro de Ciências Agrárias que de alguma forma colaboraram nas diferentes etapas deste trabalho;

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Fitopatologia pela convivência e amizade, Adrieli, Betina, Bruno, Diego, Leandro, Mateus, Rafael, Robson, Silvia, Valdenir, Zamira e tantos outros que por lá passaram;

Aos meus amigos Douglas, Jhonny, Maicom e Paulo pela amizade e apoio;

A toda minha família pelos felizes finais de semana;

Aos meus irmãos pelo apoio e motivação em todos os momentos;

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

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE ANEXOS.....	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMO.....	xviii
ABSTRACT.....	xix
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS.....	2
2.1 Objetivos gerais.....	2
2.2 Objetivos específicos.....	2
3. HIPÓTESES.....	2
4. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
4.1- Origem e botânica da macieira.....	3
4.2- A cultura da macieira no Brasil.....	3
4.3- Mancha Foliar de <i>Glomerella</i>	4
4.4- Processo de infecção de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6
4.5- Controle da Mancha Foliar de <i>Glomerella</i>	8
4.6- Resistência genética.....	9
4.7- Indução de resistência.....	11
4.8- Peroxidases.....	12
4.9- Glucanases.....	13
4.10- <i>Ulva</i> sp e <i>ulvana</i>	14
5- MATERIAL E MÉTODOS.....	16
5.1- Condições de cultivo da macieira.....	16
5.2- Seleção de segregantes suscetíveis e resistentes.....	17
5.3- Obtenção e aplicação de <i>ulvana</i>	17
5.4- Origem, manutenção e produção do inóculo.....	18
5.5- Inoculação das plântulas/plantas de macieira.....	18
5.6- Avaliação da severidade da MFG.....	19
5.7- Análise microscópica do processo infeccioso.....	20
5.8- Extração protéica e quantificação das proteínas.....	21
5.9- Determinação da atividade de peroxidase.....	22
5.10- Determinação da atividade de glucanase.....	23
5.11- Delineamento experimental e análise estatística.....	23
6- RESULTADOS.....	25
6.1- Efeito da <i>ulvana</i> sobre a severidade da MFG.....	25
6.1.1- Efeito em plântulas de macieira.....	25
6.1.2- Efeito em plantas de macieira.....	27

6.2- Efeito de ulvana sobre a germinação e desenvolvimento de estruturas de infecção de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>.....	28
6.2.1- Efeito sobre a germinação de conídios.....	28
6.2.2- Efeito sobre a germinação de conídios sem apressório.....	30
6.2.3- Efeito sobre a germinação de conídios com apressório.....	32
6.2.4- Efeito sobre o comprimento do tubo germinativo de conídios com um único apressório.....	34
6.2.5- Localização de apressórios na epiderme.....	36
6.3- Quantificação de proteínas totais em plântulas.....	36
6.4- Atividade de peroxidases em plântulas.....	37
6.5- Atividade de glucanases em plântulas.....	38
7- DISCUSSÃO.....	40
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
9- ANEXOS.....	60

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Temperaturas mínimas, máximas e médias mensais na casa-de-vegetação durante a realização dos experimentos no período de maio de 2008 a fevereiro de 2009.....16
- Tabela 2.** Condições experimentais nos três ensaios com plântulas/plantas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes, inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides*.....19
- Tabela 3.** Localização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a epiderme de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes 48 horas após a inoculação.....36
- Tabela 4.** Quantificação de proteínas totais em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) com *Colletotrichum gloeosporioides*....37

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Folhas da macieira ‘Gala’ apresentando sintomas típicos de Mancha Foliar de *Glomerella* em diferentes estágios de desenvolvimento após a infecção por *Colletotrichum gloeosporioides*.. 5
- Figura 2.** Esquema ilustrativo do processo utilizado para coleta dos discos e limbos foliares (2ª e 3ª folha expandida) em plântulas de macieira. A 1ª e 4ª folhas expandidas correspondem às folhas superiores, enquanto que a 5ª, 6ª, 7ª e 8ª as folhas inferiores.....20
- Figura 3.** Efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença nas folhas superiores e inferiores de plântulas de macieira.....26
- Figura 4.** Efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença nas folhas superiores e inferiores de plantas de macieira.....27
- Figura 5.** Germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....28
- Figura 6.** Conídios e estruturas de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* desenvolvidos na superfície adaxial de folhas de macieira resistentes e suscetíveis tratadas com água ou ulvana 48 horas após a inoculação.....29
- Figura 7.** Frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* sem apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....31

Figura 8. Frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....33

Figura 9. Frequência das classes de comprimento de tubo germinativo de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com um único apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....35

Figura 10. Atividade de peroxidases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.....38

Figura 11. Atividade de glucanases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.....39

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1.** Análise de variância fatorial do efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença em folhas superiores e inferiores de plântulas/plantas de macieira.....60
- Anexo 2.** Resultado do teste t do efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença em folhas superiores de plântulas/plantas de macieira.....61
- Anexo 3.** Resultado do teste t do efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença em folhas inferiores de plântulas/plantas de macieira.....62
- Anexo 4.** Anova de regressão de dados de germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....63
- Anexo 5.** Análise de variância da germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....63
- Anexo 6.** Análise de variância da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* sem apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....64
- Anexo 7.** Resultado do teste de separação de médias Tukey da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* sem apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....65

Anexo 8. Análise de variância de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....66

Anexo 9. Resultado do teste de separação de médias Tukey de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....66

Anexo 10. Análise de variância da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....67

Anexo 11. Resultado do teste de separação de médias Tukey da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....68

Anexo 12. Análise de variância da frequência das classes de comprimento de tubo germinativo de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com um único apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....69

Anexo 13. Resultado do teste de separação de médias Tukey da frequência das classes de comprimento de tubo germinativo de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com um único apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.....70

Anexo 14. Resultado do teste t da localização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre células epidérmicas e paredes anticlinais das células epidérmicas na epiderme de plântulas de macieira às 48 horas após a inoculação..... 71

Anexo 15. Curva padrão de proteína e equação da concentração de proteína utilizando BSA (Albumina de soro bovino) como proteína padrão e reagente de Bradford diluído.....	71
Anexo 16. Análise de variância da quantificação de proteínas totais em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	72
Anexo 17. Anova de regressão de dados da atividade de peroxidases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	72
Anexo 18. Análise de variância da atividade de peroxidases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	73
Anexo 19. Resultado do teste de separação de médias Tukey da atividade de peroxidases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	73
Anexo 20. Anova de regressão de dados da atividade de glucanases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	74
Anexo 21. Análise de variância da atividade de glucanases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	74

LISTA DE ABREVIATURAS

AACPD - Área abaixo da curva do progresso da doença
ANOVA – Análise de variância
AP - Apressório
BDA - Batata-dextrose-ágar
BSA - Albumina de soro bovino
CE - Células epidérmicas
CN – Conídio
DAI - Dias antes da inoculação
DPI - Dias pós-inoculação
GLU - Glucanases
HAI - Horas após a inoculação
MFG - Mancha foliar de Glomerella
NS - Não significativo
PA - Paredes anticlinais das células epidérmicas
PIM - Produção integrada de maçãs
POX - Peroxidases
TG - Tubo germinativo
 \bar{x} - Média
1AP - Um apressório
1AP+1TG - Um apressório e um tubo germinativo
1TG - Um tubo germinativo
>1AP - Mais de um apressório
>1TG - Mais de um tubo germinativo
 $\leq 10 \mu\text{m}$ - Tubo germinativo curto
>10 μm - Tubo germinativo longo

Mecanismos de resistência inata e induzida por ulvana à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., agente causal da Mancha Foliar de Glomerella em macieira (*Malus domestica* Borkh.)

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar os mecanismos de defesa inata e induzida pela aplicação de ulvana à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira. Para tanto, plântulas resistentes foram tratadas com água destilada aos 6 dias antes da inoculação (DAI), enquanto que suscetíveis foram pulverizadas com ulvana (10mg/mL). Plântulas foram inoculadas com *C. gloeosporioides* e a severidade da Mancha Foliar de Glomerella (MFG) foi avaliada diariamente de 4 a 10 dias pós-inoculação (DPI), baseada na estimativa visual da porcentagem de tecido necrosado. Aos 10 DPI, todas as folhas foram destacadas e escaneadas para determinar a área foliar necrosada usando o Software Quant. A germinação dos conídios e a formação de apressórios de *C. gloeosporioides* foi avaliada às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) na 2^a e 3^a folha expandida de plântulas. Discos foliares foram coletados, clareados e conservados em lactoglicerol até o exame em microscópio óptico. As atividades de peroxidases e glucanases foram determinadas em tecidos remanescentes da 2^a e 3^a folha expandida de plântulas de macieira às 24, 48 e 72 HAI. Plântulas com resistência inata nunca apresentaram sintomas da MFG. A ulvana pulverizada aos 6 DAI reduziu significativamente a severidade da MFG em plântulas. A germinação de conídios de *C. gloeosporioides* não foi alterada pela resistência inata ou induzida por ulvana. O desenvolvimento de estruturas de infecção em plântulas resistentes foi semelhante às testemunhas, no entanto a pulverização com ulvana inibiu a formação de apressórios e alongamento do tubo germinativo do fungo. A resistência inata e induzida por ulvana aumentou a atividade de POX em plântulas de macieira, mas a atividade de GLU não foi alterada. Em suma, a resistência inata da macieira a MFG parece estar relacionada ao rápido reconhecimento do *C. gloeosporioides* com maior atividade de POX às 24 HAI. A redução da MFG por ulvana foi associada à menor formação de apressórios e alongamento do tubo germinativo de *C. gloeosporioides*, além do aumento da atividade de POX em plântulas às 72 HAI.

Innate defense mechanisms and induced by ulvan to infection of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., the causal agent of Glomerella Leaf Spot in apple (*Malus domestica* Borkh.)

ABSTRACT

This study aimed to evaluate and compare the innate defense mechanisms and induced by the application of ulvan by infection of *Colletotrichum gloeosporioides* in apple. The resistance seedlings were treated with distilled water (control) 6 days before inoculation (DBI), while susceptible was sprayed with ulvan (10 mg/mL). Seedlings were inoculated with *C. gloeosporioides* and severity Glomerella Leaf Spot (GLS) was assessed daily from 4 to 10 days post-inoculation (DPI), based on visual estimation of the percentage of necrotic tissue. At 10 DPI all the leaves were detached and scanned to determine leaf area necrosis using Software Quant. Conidial germination and appressoria formation of *C. gloeosporioides* was evaluated at 24, 48 and 72 hours after inoculation (HAI) in 2nd and 3rd expanded leaf of seedlings. For this, foliar discs (9mm) were collected, leached and maintained in lactoglycerol until microscopical examination. The peroxidases and glucanases activity was determined in tissue remaining of the 2nd and 3rd expanded leaf of seedlings apple at 24, 48 and 72 HAI. Seedlings with innate resistance never showed symptoms of GLS. Ulvan sprayed at 6 DBI significantly reduced the severity of the GLS in seedlings. Conidial germination of *C. gloeosporioides* was not changed by either innate resistance or induced by ulvan. The development of structures of infection in resistance seedlings was similar to controls, however the ulvan spraying inhibited appressorium formation and germ tube elongation of fungus. Both innate resistance and induced by ulvan increased the POX activity of apple seedlings, but the activity of GLU was not changed. In sum, the innate resistance of apple against GLS seems to be related to the rapid recognition of *C. gloeosporioides* with increased activity of POX at 24 HAI. Disease reduction by ulvan was associated with a lesser appressorium formation and germ tube elongation of *C. gloeosporioides*, as well as enhanced POX activity in seedlings at 72 HAI.

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A maçã é a segunda fruta de clima temperado mais importante no Brasil, sendo Santa Catarina o principal estado produtor. Entre os fatores que afetam a produtividade da macieira, destacam-se o baixo número de horas de frio, além da alta precipitação e umidade relativa do ar na primavera/verão que favorecem a ocorrência de doenças. A Mancha Foliar de Glomerella (MFG, *Colletotrichum gloeosporioides*) é hoje a principal doença de verão da macieira no Brasil, apesar de ter sido registrada pela primeira vez há pouco mais de 20 anos. A MFG pode provocar desfolhamento intenso da macieira 'Gala' e, como consequência, reduzir drasticamente a produção das plantas no ano seguinte.

O controle da MFG vem sendo feito principalmente com fungicidas aplicados durante todo o ciclo o que pode resultar em inúmeras pulverizações específicas. Embora fungicidas se mostrem eficientes no controle de macieira contra a MFG, os problemas ambientais associados ao seu uso e a constante possibilidade de aparecimento de isolados resistentes são fatores que impulsionam o desenvolvimento de medidas alternativas e/ou complementares de controle. Dentre estas medidas, a resistência genética é considerada uma estratégia primordial e uma das mais eficientes para o controle de doenças de plantas. Porém, atualmente não existem materiais resistentes à MFG com as características organolépticas da 'Gala', a principal cultivar plantada no Brasil.

A indução de resistência é um método moderno na proteção de plantas e mostra-se uma alternativa menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas. Entre os indutores, polissacarídeos obtidos de algas marinhas, tal como a ulvana, têm demonstrado potencial para elicitar respostas de defesa em plantas, em particular à MFG em macieira.

Apesar de já existirem informações quanto à herança genética da resistência e o potencial de ulvana para o controle da MFG, desconhece-se como e quais fases do processo infeccioso são afetadas pela resistência inata e induzida por esse polissacarídeo. Diante do exposto, os objetivos do presente trabalho foram determinar microscopicamente, em que estágio(s) ocorre o desenvolvimento das estruturas de infecção do *C. gloeosporioides*, além de monitorar a atividade enzimática de peroxidases e glucanases em plântulas resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana.

2. OBJETIVOS

2.1- Objetivo geral

Avaliar e comparar os mecanismos de defesa inata e induzida pela aplicação de ulvana à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides*, em macieira.

2.2- Objetivos específicos

Avaliar a severidade da MFG em plântulas/plantas suscetíveis tratadas preventivamente com ulvana, mantidas em casa-de-vegetação.

Determinar, microscopicamente, em que estágio(s) ocorre o desenvolvimento das estruturas de infecção do *Colletotrichum gloeosporioides* em plântulas resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana.

Monitorar a atividade enzimática de peroxidases e glucanases em plântulas resistentes e suscetíveis tratadas com ulvana.

3- HIPÓTESE

A resistência inata e induzida pela aplicação de ulvana induz respostas de defesa de modo diferenciado à infecção de *Colletotrichum gloeosporioides*, em macieira.

4- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

4.1- Origem e botânica da macieira

O provável centro de origem da macieira está entre o Cáucaso e o leste da China. O início do desenvolvimento das espécies atuais da macieira (*Malus domestica* Borkh.), provavelmente ocorreu após o final da última era glacial há 20 mil anos. Os povos euro-asiáticos devem ter colaborado para a disseminação das formas primitivas das macieiras atuais (Bleicher, 2002).

A macieira é uma espécie de fruteira lenhosa, decídua, temperada que é muito adaptável a diferentes climas, crescendo desde os trópicos até altas latitudes. Pertence à família das Rosaceae e subfamília Pomoideae, caracterizada por um profundo receptáculo floral em forma de taça. As flores são brancas ou rosas dispostas em inflorescência denominada umbela. O fruto é um pomo, constituído por grande receptáculo carnudo que envolve os ovários, cujo endocarpo é coriáceo ou pétreo. A macieira é uma espécie alógama, necessitando da transferência do pólen de uma planta para o estigma de outra, para que haja fertilização do óvulo e conseqüentemente produção de sementes e fruto (Iuchi, 2002).

4.2- A cultura da macieira no Brasil

No Brasil, o cultivo da macieira é uma atividade relativamente recente. No início da década de 70, a produção anual de maçãs era cerca de 1.528t (Boneti *et al.*, 2002). Porém, com incentivos fiscais e apoio à pesquisa e extensão rural, o país passou de importador a auto-suficiente com potencial de exportação, com uma produção média na última década de 900.000t (Mapa, 2009). A maçã é a segunda fruta de clima temperado mais importante no Brasil (Icepa, 2007).

A produção de maçãs está concentrada na região sul do Brasil, sendo o estado de Santa Catarina o maior produtor com 18.360ha plantados e responsável por 51% da produção nacional. O estado do Rio Grande do Sul possui 15.840ha plantados e responde por 44% da produção, enquanto que o Paraná tem 1.800ha da área plantada e 5% da produção de maçã (Mapa, 2009). Os estados do Sul possuem as melhores condições para a cultura no Brasil, devido à quantidade de horas-frio que é considerada suficiente para atender às necessidades exigidas pela planta, proporcionando condições para se alcançar uma produtividade competitiva e melhor qualidade do fruto (Icepa, 2007). Entre os fatores que afetam a produtividade da macieira, destacam-se o

baixo número de horas de frio (Petri *et al.*, 2002), além da alta precipitação e umidade relativa do ar na primavera/verão que favorecem a ocorrência de doenças (Boneti *et al.*, 2004). O controle de doenças tem sido o principal fator limitante da cultura na atualidade, respondendo por cerca de 20% do custo de produção (Katsurayama & Boneti, 2009).

As principais variedades cultivadas no Brasil são a ‘Gala’ (58%) e a ‘Fuji’ (36%) (Abpm, 2009). Além disso, grande parte dos novos plantios está sendo feita com mutações derivadas da ‘Gala’ ou ‘Fuji’, por exemplo: ‘Royal Gala’, ‘Imperial Gala’, ‘Fuji Suprema’ e ‘Fuji Kiku 8’ (Brde, 2000). Há também outras cultivares recentemente desenvolvidas portadoras do gene *Vf* que confere resistência à sarna (*Venturia inaequalis* (Cooke) Winter), como é o caso das cultivares ‘Catarina’, ‘Duquesa’, ‘Fred Hough’ e a ‘Joaquina’ (Stadnik *et al.*, 2009a).

4.3- Mancha Foliar de Glomerella

A Mancha Foliar de Glomerella (MFG, sinonímia Mancha Foliar da Gala) é uma doença que vem sendo considerada nos últimos anos a principal doença de verão da macieira (Becker *et al.*, 2000). A MFG foi observada pela primeira vez em 1983 em pomares de macieira no estado do Paraná (Leite *et al.*, 1988). Desde então, a frequência da doença vem aumentando, sendo que atualmente ocorre em praticamente todas as regiões produtoras de maçãs no Brasil, inclusive em altitudes acima de 1.400m (Boneti *et al.*, 2004). A MFG manifesta-se principalmente no verão, quando pode provocar desfolhamento superior a 75% e como consequência, reduzir drasticamente a produção das plantas no ano seguinte (Boneti & Katsurayama, 1999).

Os sintomas iniciais da doença são manchas de coloração variando de vermelho a roxo, dois dias após a infecção em plantas inoculadas e que evoluem para uma mancha necrótica com formato irregular. As folhas lesionadas ficam inteiramente marrom e desidratadas, ou amarelecem e caem entre oito a dez dias (Crusius *et al.*, 2002) (Fig. 1). Nos frutos surgem numerosas pontuações deprimidas, de aproximadamente 1mm de diâmetro e de cor marrom-clara a marrom-escura. Nos ramos verdes, também são visíveis sintomas da MFG que surgem em lesões longitudinais, de cor marrom clara, que se tornam corticentas e com borda saliente (Katsurayama & Boneti, 2009).

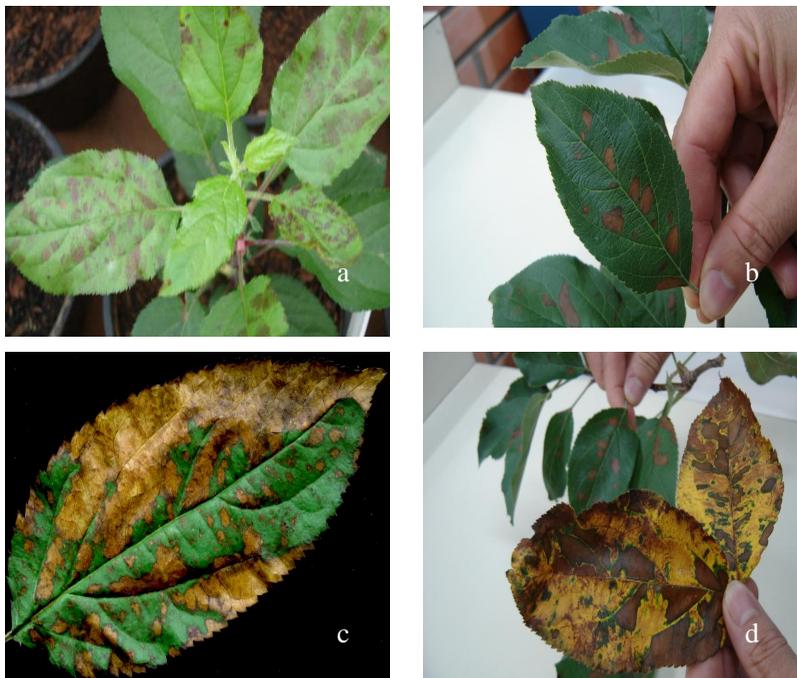


Figura 1: Folhas da macieira ‘Gala’ apresentando sintomas típicos de Mancha Foliar de *Glomerella* em diferentes estágios de desenvolvimento após a infecção por *Colletotrichum gloeosporioides*. (a) Sintomas iniciais entre 2 e 4 dias pós-infecção (DPI); (b) Manchas necróticas entre 4 e 6 DPI; (c) Folhas com manchas desidratadas com desfolha entre 8 a 10 DPI; (d) Folhas amareladas com desfolha entre 8 a 10 DPI.

À MFG é causada principalmente pelo anamorfo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., pertencente à classe Deuteromycetes, ordem Melanconiales, família Melanconiaceae (Boneti & Katsurayama, 1999). Porém, *C. acutatum* J.H. Simmonds pode estar associado também à doença, sendo, contudo, pouco frequente (Becker *et al.*, 2000; Crusius *et al.*, 2002). Nos EUA, *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & Scherenk que corresponde à fase perfeita (sexual) de *C. gloeosporioides*, tem sido associada à MFG em pomares de maçã (Gonzales & Sutton, 2004; Gonzales *et al.*, 2006). Os conídios de *C. gloeosporioides* são hialinos em forma de bastonetes (Becker *et al.*, 2000). Em meio de cultura, *C. gloeosporioides*

caracteriza-se pela produção de peritécios em isolados homotáticos e ausência da fase sexuada *in vitro* em isolados heterotáticos (Katsurayama & Boneti, 2009).

Não se sabe ao certo ainda como o *C. gloeosporioides* sobrevive de um ano para o outro, pois existem poucos estudos e muitas informações desconhecidas sobre o assunto (Stadnik *et al.*, 2009a). Sabe-se que isolados de *C. gloeosporioides* produzem peritécios *in vitro*, mas a campo estes não foram encontrados em folhas infectadas caídas ao solo, indicando que possivelmente a fase sexuada não seja importante para a sobrevivência do fungo (Crusius *et al.*, 2002). Além disso, a sobrevivência de *C. gloeosporioides* tem sido associada à presença do fungo sobre ramos e gemas dormentes de plantas infectadas da safra anterior (Crusius *et al.*, 2002; Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 2002). Porém, há relatos que o fungo possa sobreviver em frutos mumificados, em cancrios e na superfície das plantas, nas fases sexuada e assexuada (Valdebenito-Sanhueza & Betti, 2005). Resumindo, ramos e gemas infectados, além de frutos mumificados parecem ser a fonte de inóculo inicial da doença (Stadnik *et al.*, 2009a).

À semelhança do que ocorre em outros Coelomycetes, os respingos de água também são imprescindíveis para liberar e disseminar os conídios contidos nas massas mucilaginosas dos acérvulos de *C. gloeosporioides* (Stadnik *et al.*, 2009a). Longos períodos de molhamento foliar, alta umidade relativa do ar e temperaturas elevadas são as principais condições favoráveis à infecção pelo fungo (Hamada, 2005a). A infecção por *C. gloeosporioides* pode ocorrer entre 14 a 32°C, com um ótimo a 24°C. O período de molhamento foliar pode variar de acordo com a temperatura, a 14°C são necessárias 32h para que ocorra a infecção por *C. gloeosporioides*, enquanto que a 30°C apenas 2h são suficientes (Crusius *et al.*, 2002).

4.4- Processo de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides*

As fases iniciais do desenvolvimento de infecção do gênero *Colletotrichum* são semelhantes para todas as espécies, podendo ser separados em fases, incluindo: deposição de conídios na superfície das plantas; fixação dos conídios sobre a superfície; germinação de conídios; produção de apressórios; penetração na epiderme da planta; crescimento e colonização de tecidos vegetais; desenvolvimento de lesões e produção de acérvulos e esporulação (Wharton & Diégués-Uribeondo, 2004).

Logo após a deposição na superfície das folhas, os conídios de *C. gloeosporioides*, em contacto com um filme de água na superfície da folha, iniciam o processo de germinação, alongação do tubo germinativo, formação de apressório e penetração pela hifa infectiva (Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2005). A germinação e a diferenciação do tubo germinativo em apressório ocorrem entre 3 e 48h, e sua velocidade é fortemente influenciada por fatores ambientais. A penetração dos tecidos do hospedeiro, por *Colletotrichum* spp. depende geralmente da formação de estruturas especializadas de infecção, denominadas apressórios. Apressórios são formados pela diferenciação e inchaço da extremidade do tubo germinativo, e permitem que o fungo possa penetrar diretamente a cutícula e a parede celular do hospedeiro por meio de uma hifa infectiva, a qual emerge a partir do poro do apressório. Apesar de raro em *Colletotrichum* spp., há relatos de penetração indireta do tecido através de estômatos ou feridas sem a formação de apressórios (Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004). A impregnação de melanina nas paredes do apressório de *Colletotrichum* permite a formação de uma extraordinária pressão osmótica. Esta é traduzida em uma força de penetração de $16,8 \pm 3,2$ μN , concentrada na ponta da hifa infectiva (Mendgen & Hahn, 2002). Fungos fitopatogênicos de plantas invadem a cutícula e a parede celular de seu hospedeiro através da secreção de enzimas líticas, pressão de turgor, força mecânica, ou a combinação de ambas (Bastmeyer *et al.*, 2002).

Duas estratégias de colonização nos tecidos de plantas têm sido descritos em *Colletotrichum* spp. baseadas na colonização e interação com o hospedeiro: intracelular hemibiotrófica e intramural subcuticular necrotrófica (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005). Na colonização intracelular hemibiotrófica, a hifa infectiva penetra nas células epidérmicas e forma as vesículas de infecção. Logo após, as hifas primárias colonizam a epiderme adjacente e células do mesófilo. Durante as fases iniciais deste tipo de colonização, a interação entre o hospedeiro e patógeno é biotrófica, com duração de 24 à 72h com as células hospedeiras permanecendo vivas. A subsequente interação necrotrófica coincide com o desenvolvimento de visíveis sintomas em forma de áreas encharcadas que evoluem para lesões necróticas. Esta interação é também caracterizada pela formação de hifas secundárias finas que crescem inter e intracelularmente, enquanto secretam enzimas que degradam a parede celular e matam células do hospedeiro (Wharton & Diéguas-Uribeondo,

2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2005).

Na colonização intramural subcuticular necrotrófica, a interação é em grande parte necrotrófica e a fase biotrófica é muito curta com menos de 24h de duração, ou mesmo, não ocorre. A hifa infectiva não consegue penetrar imediatamente na epiderme adjacente e células do mesófilo, mas se desenvolve sob a cutícula e dentro das paredes anticlinais e periclinais das células epidérmicas. Hifas intramurais se desenvolvem associadas com o inchaço e dissolução das paredes celulares do hospedeiro. Após o período sem sintomas, o fungo começa a espalhar-se rapidamente por todo o tecido do hospedeiro, tanto inter e intracelularmente matando as células hospedeiras e dissolvendo paredes das células antes da infecção (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2005).

A maior parte das espécies de *Colletotrichum* coloniza o hospedeiro através da interação intracelular hemibiotrófica (Wharton *et al.*, 2001; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005). No entanto, *Colletotrichum* spp. podem colonizar o tecido de plantas através da interação intracelular hemibiotrófica e/ou intramural subcuticular necrotrófica, dependendo do hospedeiro, tecido e cultivares com diferentes níveis de resistência (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005).

4.5- Controle da Mancha Foliar de *Glomerella*

A pulverização com fungicidas de contato e protetores é o método mais utilizado para o controle da MFG, porém, não são muito eficientes quando a pressão de inóculo é muito alta (Becker *et al.*, 2000). Por não se conhecer fungicidas com ação curativa, recomenda-se que os tratamentos sejam efetuados preventivamente, no mais tardar a partir da constatação das primeiras lesões e repetidos em intervalos de cinco a dez dias, sempre que houver um acúmulo de 30mm ou mais de chuva, contando a partir da última pulverização (Boneti *et al.*, 2004). Isto resulta em cerca de 16 pulverizações específicas para o controle desta doença, que iniciam a partir do final da floração (outubro) até o período pós-colheita da maçã (Becker *et al.*, 2000).

Devido aos constantes relatos de resíduos de agrotóxicos nos alimentos *in natura* (Scussel & Galvão, 2009), o mercado interno e externo vem, cada vez mais, exigindo frutas produzidas sob determinados cuidados. Essas novas exigências e uma maior conscientização ambiental fazem com que agricultores e técnicos

mudem seu comportamento em relação aos sistemas de produção (Stadnik *et al.*, 2009a). Preocupado em adequar-se aos novos requisitos de mercado, como segurança alimentar, sustentabilidade ambiental e saúde humana, o setor frutícola do país adota outras formas de cultivo tais como o Sistema de Produção Integrada (Garrido *et al.*, 2004).

Atualmente o Sistema de Produção Integrada de maçãs (PIM) vem ganhando cada vez mais espaço no país. A concepção do PIM torna clara a necessidade de proteger o ambiente e os recursos naturais, considerando o contexto sócio-econômico em que se desenvolve a produção. Apesar disso, o PIM tem como objetivo reduzir, substituir ou até mesmo eliminar o uso de agrotóxicos (Stadnik *et al.*, 2009b). O PIM enfatiza a antecipação e prevenção dos problemas sempre que seja possível. Utilizam-se todas aquelas técnicas que potencializam a ação dos inimigos naturais, a resistência das plantas, adotando práticas culturais e biológicas recorrendo ao uso de agrotóxicos em última instância de forma racional (Mondino, 2004). Stadnik *et al.* (2009b) relatam que as formas de controle de doenças empregados no PIM se baseiam em uma pirâmide, sendo que quanto mais basais estiverem os métodos, maiores serão sua abrangência, eficiência, economia, estabilidade e sustentabilidade da atividade produtiva. Entre os métodos mais basais da pirâmide do PIM, destacam-se a resistência inata e induzida pelo uso de indutores de origem biótica ou abiótica, manejo de agroecossistemas e controle biológico (Stadnik *et al.*, 2009b).

4.6- Resistência genética

A resistência genética a doenças pode ser definida como a habilidade do hospedeiro em impedir o crescimento e o desenvolvimento do patógeno (Camargo, 1995). As plantas ao longo do processo evolutivo desenvolveram mecanismos de resistência a doenças que envolvem complexas alterações no metabolismo celular. Este processo é realizado pela interação entre os produtos de genes específicos de resistência do hospedeiro e o produto do gene de avirulência do patógeno (Nishimura & Somerville, 2002).

As coleções de germoplasma se constituem na matéria-prima do melhoramento genético, evitando ou diminuindo a vulnerabilidade causada pela utilização de bases genéticas estreitas. Geralmente, é necessário explorar novas fontes de variabilidade genética, seja para encontrar características específicas de interesse como resistência a doenças, pragas e estresses ambientais (Dantas *et al.*, 2009). A obtenção de materiais resistentes às doenças são de grande importância para a

cultura da maçã, já que atualmente cerca de 20% do custo de produção é relativo ao controle das mesmas (Katsurayama & Boneti, 2009).

Na cultura da maçã, a MFG afeta as cultivares Gala, Senshu e descendentes da ‘Golden Delicious’. Assim, a ‘Gala’, que é a principal cultivar plantada no sul do Brasil, apresenta alta suscetibilidade, enquanto a ‘Fuji’ que é descendente do grupo ‘Delicious’ e cultivar de segunda maior importância, apresenta resistência inata à doença (Becker *et al.*, 2000). Atualmente, a substituição das variedades suscetíveis é de difícil implantação, pois não existem materiais resistentes à MFG com as características organolépticas da ‘Gala’ (Dantas *et al.*, 2009), cultivar que representa 58% da produção brasileira de maçãs (Abpm, 2009).

Uma alternativa para a obtenção de novos materiais resistentes à MFG seria o desenvolvimento de mapas genéticos que contenham o gene (ou genes) de resistência a *C. gloeosporioides*, obtidos através do grupo ‘Delicious’ (Dantas *et al.*, 2009). Trabalhos buscando o gene de resistência a MFG vêm sendo desenvolvidos pelas instituições de pesquisa e indicam que a reação identificada nas populações resistentes é de caráter monogênico recessivo (Dantas *et al.*, 2009). A resistência monogênica, vertical ou qualitativa, caracteriza-se por ter apenas um gene como fonte de resistência, uma distribuição descontínua no fenótipo, de tal modo que indivíduos resistentes podem ser facilmente distinguidos dos suscetíveis (Camargo, 1995). No entanto, apesar da resistência monogênica ser mais fácil de ser manipulada em programas de melhoramento, a obtenção de uma nova cultivar com um único gene de resistência a *C. gloeosporioides* possibilitaria a vulnerabilidade a novas raças do patógeno em condições de elevada pressão de seleção. Um exemplo de quebra de resistência monogênica ocorreu na Alemanha por *V. inaequalis*, sendo que os novos materiais resistentes à sarna possuíam somente um gene de resistência (*Vf*), oriundo da macieira silvestre *Malus floribunda* Sieb. A rápida disseminação desta estratégia pelas regiões produtoras gerou forte pressão de seleção sobre as populações do patógeno. Isto levou à seleção natural de duas raças de *V. inaequalis* que superaram a resistência conferida pelo gene *Vf* (Parisi *et al.*, 1993). Para o *C. gloeosporioides*, até o momento, não há relato de raças, contudo isso é possível visto que o fungo possui uma grande variabilidade genética (Gonzales & Sutton, 2004; Hamada, 2005b; Gonzales *et al.*, 2006).

4.7- Indução de resistência

A resistência de um hospedeiro pode ser definida como a capacidade da planta em atrasar ou evitar a entrada e/ou subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos (Stadnik & Maraschin, 2004). As plantas possuem complexos mecanismos de defesa aos patógenos. Alguns desses mecanismos são constitutivos, representados por estruturas físicas como camada de ceras, cutícula, parede celular espessa, tricomas, adaptações em estômatos e fibras vasculares, e também por substâncias químicas como os fenóis, alcalóides, lactonas insaturadas, glicosídeos fenólicos, glicosídeos cianogênicos, fitoxinas, inibidores protéicos e enzimas hidrolíticas (Agrios, 2005). Por outro lado, existem mecanismos de defesa que são ativados após o reconhecimento do agente agressor pelo hospedeiro. Esses mecanismos podem envolver a formação de papilas, halos, lignificação, camada de cortiça e formação de tiloses, além da síntese de compostos como as fitoalexinas, proteínas relacionadas à patogênese e espécies ativas de oxigênio (Pascholati & Leite, 1995).

A indução de resistência é um fenômeno muito comum na natureza, onde alguns tipos de estresses ou uma pré-infecção com um patógeno tornam as plantas mais resistentes à infecção subsequente por outros patógenos (Stadnik & Maraschin, 2004). A resistência pode ser expressa no local da infecção ou sistemicamente quando a liberação de um sinal a partir da folha infectada e translocados para outras partes da planta que induz reações de defesa (Métraux, 2001). O aumento dos níveis de resistência da planta, como uma consequência da ativação de seus genes ou grupos de genes aparentemente inativos, usando agentes externos (bióticos ou abióticos), sem a modificação do genoma da planta, é conhecido como resistência induzida. A indução de resistência é um método moderno e alternativo para a proteção de plantas e mostra-se uma alternativa menos agressiva à saúde humana e ao equilíbrio de agroecossistemas (Stadnik & Maraschin, 2004). Segundo Steiner & Schönbeck (1995), existem alguns critérios básicos para confirmar a real ocorrência de resistência induzida, sendo que estes autores a caracterizaram pela: ausência de efeitos tóxicos do agente indutor sobre o patógeno; possibilidade de se suprimir a resistência induzida por agentes que inibem a expressão de genes do hospedeiro; necessidade de um intervalo de tempo entre exposição da planta ao indutor e a expressão da resistência; falta de relação entre magnitude da resistência expressa e quantidades do indutor aplicado; efeito local e sistêmico;

inespecificidade da proteção e pela dependência do ambiente e do genótipo.

A indução de resistência em plantas é inicialmente desencadeada pela presença de espécies ativas de oxigênio, que são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas na via metabólica de transformação do oxigênio molecular (O₂) em água (H₂O). Após o reconhecimento do patógeno, o hospedeiro libera uma grande quantidade de espécies ativas de oxigênio (H₂O₂), como resposta de defesa da planta que poderiam atuar como mensageiros secundários na cascata de transdução de sinais para ativação de genes de defesa e de proteção celular. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂) ativa a enzima 2-hidrolase que é responsável pela conversão do ácido benzóico em ácido salicílico, um composto que participa das rotas metabólicas relacionadas à ativação de genes de defesa. Assim, espécies ativas de oxigênio (H₂O₂) são em geral, apontadas como intermediárias na complexa malha de sinalização para as respostas de resistência local e sistêmica (Resende *et al.*, 2003).

Após a sinalização no hospedeiro para as respostas de resistência local e sistêmica, a planta induz rapidamente seus mecanismos de ação que são muito eficientes contra a invasão de patógenos. Os mecanismos de ação induzidos pela planta incluem alterações da parede celular, a produção de fitoalexinas, síntese de proteínas relacionadas à patogênese, por exemplo, peroxidases e glucanases, e ativação da reação de hipersensibilidade (Ryals *et al.*, 1994; Métraux, 2002).

4.8- Peroxidases

As peroxidases são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese e pertencem à família PR-9. Estas enzimas são glicoproteínas capazes de catalizar a produção de H₂O₂, a formação de lignina, incorporação de glicoproteínas à parede celular, destruição peroxidativa do ácido indolilacético e de outros reguladores de crescimento (van Loon *et al.*, 2006). As enzimas peroxidases, superóxido dismutase e a catalase, podem atuar sobre as espécies ativas de oxigênio de modo a livrar a célula de seu efeito deletério (Resende *et al.*, 2003). Dentre outras funções das peroxidases elas estão envolvidas em respostas de hipersensibilidade, formação de papila (Baysal & Zeller, 2005) e participam da oxidação de compostos fenólicos, os quais se acumulam em resposta à infecção (van Loon *et al.*, 2006). Elas catalizam a oxidação e eventual polimerização de álcool hidrocínâmico,

na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), originando a lignina, que juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que se acumulam na parede celular das células vegetais, funcionam como uma barreira física à penetração fúngica (Stadnik & Buchenauer, 2000).

Em macieira tem se utilizado como indutores de resistência acibenzolar Brisset *et al.*, 2000), DL-3 ácido aminobutírico (Hassan & Buchenauer, 2007) e extrato de *Hedera helix* L. (Baysal & Zeller, 2005) para o fogo bacteriano. O controle dessa doença tem sido associado à elevação da atividade de peroxidases, que podem favorecer o espessamento do parênquima e paredes celulares, dificultando o estabelecimento e multiplicação de *Erwinia amylovora* (Burrill) Winslow nos espaços intercelulares.

4.9- Glucanases

As glucanases são classificadas como proteínas relacionadas à patogênese e pertencem à família PR-2 (van Loon *et al.*, 2006). São enzimas líticas que hidrolisam as β-1,3 glucana que juntamente com a quitina, são componentes da parede celular dos fungos e bactérias (Pascholati & Leite, 1995). A família PR-2 é constituída por endo-β-1,3-glucanas e são agrupadas em pelo menos três classes distintas. As glucanases da classe I são proteínas básicas, localizadas no vacúolo, especialmente na epiderme das folhas inferiores e nas raízes de plantas, enquanto que as classes II e III incluem principalmente as proteínas ácidas extracelulares (van Loon *et al.*, 2006). As formas extracelulares possuem função imediata na defesa de plantas, com ação direta sobre as hifas invasoras (ação fungicida). Esta ação provoca a liberação de oligossacarídeos biologicamente ativos (elicitores e supressores) a partir das paredes fúngicas os quais podem levar à ativação de outros mecanismos locais ou sistêmicos de resistência nas plantas. As formas intracelulares parecem atuar tardiamente nas reações de defesa das plantas (Pascholati & Leite, 1995; Baysal & Zeller, 2005)

Em plântulas de macieira, a indução de resistência por acibenzolar tem sido frequentemente associada com a ativação de glucanases, que se acumulam local e sistemicamente, controlando o fogo bacteriano (Brisset *et al.*, 2000). Pulverizações foliares de acibenzolar e quitosana controlaram *C. acutatum* do morangueiro (*Fragaria vesca* L.), devido à elevação em 680% da atividade de glucanases (Mazaro, 2007). Em cafeeiro (*Coffea arabica* L.), pulverizações preventivas de *Bacillus thuringiensis* Berlinier (Bt)

controlaram *Hemileia vastatrix* Berk & Br., através de um forte aumento local e sistêmico da atividade da glucanase (Guzzo & Martins, 1996).

4.10- *Ulva* sp e *ulvana*

As macroalgas são organismos muito diversificados e de ocorrência freqüente em ambientes marinhos. Apresentam vantagens como rápido crescimento e produção de grande volume de biomassa, além de terem ampla ocorrência no litoral brasileiro e algumas espécies serem facilmente cultivadas. Estes são atributos importantes que podem possibilitar a exploração comercial para a produção de matéria prima para os mais variados usos, além daqueles já conhecidos, tais como produção de alimentos, fabricação de ágar, fertilizantes, fármacos e cosméticos (Stadnik & Paulert, 2008). Algas produzem diversos compostos bioativos de interesse agrícola capazes de inibir o crescimento de bactérias e fungos, além de estimularem o crescimento e/ou fortalecer as defesas da planta contra o ataque de patógenos (Talamini & Stadnik, 2004).

O litoral brasileiro apresenta uma grande diversidade de macroalgas marinhas, com destaque para o gênero *Ulva* que, apesar de ter poucos conhecimentos sobre sua potencialidade, esta apresenta resultados promissores no controle de doenças de plantas (Abreu *et al.*, 2008). A *Ulva* sp é popularmente conhecida como alface do mar, sendo considerada uma das mais comuns e abundantes algas verdes do mundo (Lahaye & Robic, 2007). Apesar disso, é mal utilizada e apenas uma pequena parte da biomassa é utilizada na alimentação humana ou animal (Paulert *et al.*, 2009), sendo que 38 a 52 % do peso seco da alga são representados por polissacarídeos (Lahaye & Robic, 2007). Polissacarídeos obtidos de algas aplicados como fitoprotetores em plantas podem apresentar diferentes formas de atividade biológica, tais como elicitação de respostas de defesa da planta (Klarzynski *et al.*, 2000; Cluzet *et al.*, 2004; Stadnik *et al.*, 2009c).

No Brasil, alguns trabalhos vêm demonstrando o efeito potencial dos extratos e polissacarídeos obtidos de algas marinhas no controle de patógenos. A aplicação de extratos de *Ulva fasciata* Delile aumentaram em 20% o peso seco do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L) (Paulert *et al.*, 2009), além de reduzirem local e sistemicamente a severidade da antracnose (*C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib.) em 22 e 44%, respectivamente (Abreu *et al.*, 2008). Duas pulverizações preventivas de *ulvana*, polissacarídeo obtido da *U. fasciata* controlaram

significativamente a severidade da antracnose (Fernandes, 2007; Paulert *et al.*, 2009) e ferrugem (*Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger) do feijoeiro (Borsato, 2009). Em macieira, Araújo *et al.* (2008) realizaram pulverizações de ulvana em plântulas aos 6 DAI com *C. gloeosporioides* e encontraram redução da severidade local e sistêmica da MFG em torno de 65%.

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1- Condições de cultivo da macieira

As plântulas/plantas foram cultivadas em condições de casa-de-vegetação no período de maio de 2008 a fevereiro de 2009 (Tab. 1).

Tabela 1: Temperaturas mínimas, máximas e médias mensais na casa-de-vegetação durante a realização dos experimentos no período de maio de 2008 a fevereiro de 2009.

Mês	Temperatura Mensal (°C)		
	Mínima (\bar{x})	Máxima (\bar{x})	\bar{x} (Média)
Maio	14,0	26,0	20,0
Junho	8,0	26,0	17,0
Julho	9,0	23,0	16,0
Agosto	14,0	28,0	21,0
Setembro	16,0	31,0	23,5
Outubro	18,0	32,0	25,0
Novembro	18,0	35,0	26,5
Dezembro	19,0	37,0	28,0
Janeiro	19,0	40,0	29,5
Fevereiro	20,0	40,0	30,0

As sementes foram fornecidas pela Dra. Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza da Embrapa Uva e Vinho, sendo oriundas de frutos de macieira ‘Gala’ de um pomar com a polinizadora ‘Fuji’. As plântulas foram obtidas de sementes de acordo com metodologia adaptada de Brisset *et al.* (2000), Faize *et al.* (2006) e Hassan & Buchenauer (2007). Para tanto, distribuíram-se 25 sementes entre camadas de algodão previamente umedecido em caixa plástica do tipo ‘gerbox’ (11cm x 11cm e 3,5cm de altura). Logo após, as sementes foram mantidas a $5\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 50 dias para a quebra da dormência. Sementes germinadas que apresentavam radículas de comprimento $\geq 2\text{cm}$ foram transferidas para sementeiras de isopor (68cm x 34cm e 6cm de altura), contendo substrato solo Neossolo Flúvico. Após 30 dias, as plântulas foram repicadas para vasos plásticos de 1L contendo uma mistura de composto orgânico e solo Neossolo Flúvico (1:2; v/v) onde cresceram por mais 45 dias até apresentarem de dez a 15 folhas expandidas. Plântulas foram irrigadas de acordo com as suas necessidades hídricas e adubadas com 0,25g de fosfato monoamônio (12-61-0) em cada vaso aos 45 dias de idade.

Oídio e pulgões foram controlados com pulverizações semanais de enxofre 80% (3 g/L, Basf, Brasil) e inseticidas decis C.E. (3 mL/L, Agrevo, Brasil) e malathion C.E. (3 mL/L, Dipil, Brasil), respectivamente. Um dia antes do tratamento, o excesso de resíduo de enxofre foi retirado por meio de lavagem das folhas. Para separar as folhas tratadas daquelas que se desenvolveram após o tratamento, colocou-se um anel plástico na região do pecíolo foliar, logo acima da última folha expandida.

Plântulas com três meses de idade foram podadas e a partir de então, foram denominadas plantas. Durante a poda, manteve-se somente as duas últimas folhas de cada estaca. Adicionalmente, as plantas foram pulverizadas com folpan P.M. (2,1 g/L, Hokko, Brasil) para eliminar possível infecção de *C. gloeosporioides*. Sete dias após a realização da poda, adubaram-se as plantas com fosfato monoamônio (12-61-0), conforme descrito anteriormente. Dez dias após a realização da poda, por ocasião da brotação das gemas, destacaram-se as duas últimas folhas. A gema mais vigorosa de cada estaca foi mantida, enquanto as demais foram eliminadas manualmente. Um mês após a poda, as plantas possuíam de dez a 15 folhas e foram usadas no ensaio.

5.2- Seleção de segregantes suscetíveis e resistentes

Como as plântulas eram oriundas de sementes de frutos de macieira ‘Gala’ com polinizadora ‘Fuji’ foi necessário identificar os segregantes suscetíveis e resistentes a MFG. Para isto, utilizou-se o método de inoculação em folha destacada (Araújo & Stadnik, 2009). Em resumo, plântulas com 40 dias de idade tiveram destacada a última folha expandida e o seu pecíolo foi envolvido em algodão saturado com água. As folhas destacadas foram depositadas em caixas plásticas sobre papel filtro umedecido e pulverizadas com uma suspensão conidial de *C. gloeosporioides* até o ponto de escorrimento. Após oito dias de incubação a 25°C e 12h de fotoperíodo, avaliaram-se a incidência e a severidade (%) da MFG. Os segregantes resistentes foram identificados pela ausência de sintomas.

5.3- Obtenção e aplicação de ulvana

A ulvana foi obtida de *U. fasciata* conforme descrito por Paulert *et al.* (2009). Para tanto, 100g da alga seca *U. fasciata* coletada em 2007 foram autoclavados por 2h a 110°C em 1L de água destilada. A solução aquosa foi filtrada em uma dupla camada de pano de algodão

(22x19cm) e o polissacarídeo foi precipitado pela adição de três volumes de etanol (98°GL), seguido de resfriamento a -20°C por 48h. Os compostos precipitados foram coletados, secos a 40-45°C por 48h até peso constante e mantidos a 5°C até utilização nos ensaios.

A ulvana foi dissolvida completamente em água destilada em temperatura ambiente na concentração de 10mg/mL. As plântulas/plantas suscetíveis foram pulverizadas até o ponto de escorrimento (aproximadamente 4mL/plântula) com auxílio de uma pistola de pintura (LPHV, pressão máxima 58 psi, bico 0,7mm de diâmetro, vazão de 20mL/min, Grifo, Itália) acoplada a um compressor de ar (pressão 25lbf/pol2 e potência 180W, Schulz, Brasil) aos seis dias antes da inoculação (DAI). Plântulas/plantas resistentes e suscetíveis (testemunha) foram pulverizadas com água destilada. As plântulas/plantas tratadas permaneceram em bancadas da casa-de-vegetação até serem inoculadas.

5.4- Origem, manutenção e produção do inóculo

Utilizou-se nos ensaios o isolado MANE147 da coleção do laboratório de fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina e o isolado CGF1 da coleção da Embrapa Uva e Vinho. Ambos eram provenientes de folhas com manchas necróticas da cultivar Gala.

Os isolados de *C. gloeosporioides* foram conservados, a curto prazo, em meio de cultura em batata-dextrose-ágar (BDA: 39 g/L - extrato de batata 10%, glucose 51%, ágar 39%, Scharlau, Espanha) a 5±2°C e a longo prazo, pelo método Castellani (1939) em temperatura ambiente.

Para obtenção de inóculo, discos de 8mm das culturas fúngicas foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA. Após dez dias a 25°C e 12h de fotoperíodo, as colônias foram raspadas superficialmente com espátula de Drigalsky e a concentração da suspensão de conídios foi determinada com câmara de Neubauer.

5.5- Inoculação das plântulas/plantas de macieira

Plântulas/plantas com dez a 15 folhas foram inoculadas seis dias após a pulverização com água ou ulvana, com uma suspensão de 3×10^5 conídios/mL de *C. gloeosporioides* até o ponto de escorrimento (aproximadamente 4mL/plântula). As pulverizações foram realizadas com auxílio de pistola acoplada a motocompressor de ar, segundo especificados do item 5.3. Após a inoculação, as plântulas/plantas

permaneceram em câmara úmida no escuro a 100% UR por 24h. Findo este período, as plântulas/plantas foram transferidas para as bancadas da casa-de-vegetação, onde permaneceram até a avaliação da severidade. Para inoculação de plântulas e plantas, utilizaram-se os isolados MANE147 e CGF1, respectivamente.

5.6- Avaliação da severidade da MFG

A severidade de MFG foi avaliada em três ensaios semelhantes, conforme as condições experimentais apresentadas na tabela 2.

Tabela 2: Condições experimentais nos três ensaios com plântulas/plantas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes, inoculadas com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Condições experimentais	Ensaio		
	1	2	3
Material vegetal*	Plântulas	Plântulas	Plantas
Idade (Meses)	3	3	5
Mês da inoculação	Agosto	Dezembro	Janeiro
Temperatura pós-inoculação**	20±5 °C	26±9°C	29±9°C

* Plântulas do ensaio 2, após serem podadas foram denominadas plantas.

** Período em câmara úmida até 24h após a inoculação.

A severidade da MFG foi avaliada diariamente de quatro a dez dias pós-inoculação (DPI), baseada na estimativa visual da porcentagem de tecido necrosado de cada folha, conforme Araújo *et al.* (2008). Na última avaliação de severidade aos 10 DPI, todas as folhas foram destacadas e escaneadas para determinar a área foliar necrosada da MFG usando o Software Quant V.1.01 (Universidade Federal de Viçosa, 2003). Para tanto, as folhas foram dispostas entre uma lâmina de vidro transparente (28cm x 21cm x 0,8cm) e uma lâmina com fundo preto.

Com os dados da severidade visual, calculou-se área abaixo da curva do progresso da doença (AACPD) usando-se a seguinte fórmula: AACPD= $[(y_1+y_2)/2*(t_2-t_1)]$, onde y_1 e y_2 são duas avaliações consecutivas de severidade realizadas nos tempos t_1 e t_2 , respectivamente. A severidade da MFG foi avaliada separadamente na 1^a e 4^a folha expandida (folhas superiores) e nas 5^a, 6^a, 7^a e 8^a (folhas inferiores).

5.7- Análise microscópica do processo infeccioso

Para comparar o processo infeccioso de *C. gloeosporioides* em plântulas de macieira resistentes e suscetíveis tratadas com água ou ulvana, retiraram-se dois discos da 2ª e 3ª folhas expandidas com auxílio de um vazador (8mm diâmetro) às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) no ensaio 1 (Fig. 2).

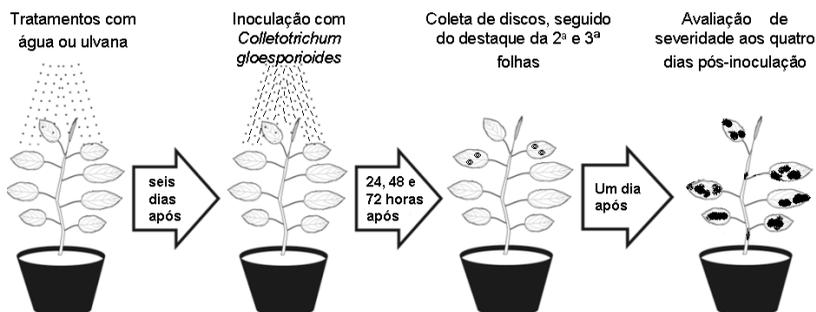


Figura 2: Esquema ilustrativo do processo utilizado para coleta dos discos e limbos foliares (2ª e 3ª folha expandida) em plântulas de macieira. A 1ª e 4ª folhas expandidas correspondem às folhas superiores, enquanto que a 5ª, 6ª, 7ª e 8ª às folhas inferiores.

Os discos foliares coletados foram processados para a realização de análise microscópica, conforme metodologia descrita por Stadnik & Buchenauer (2000). Após a coleta, os discos foram imediatamente depositados com a superfície adaxial voltada para cima em placas de Petri (9cm) contendo papel de filtro, previamente umedecido com solução de etanol e ácido acético (3:1, v/v), para a retirada da clorofila dos tecidos. O manuseio destes discos foi feito cuidadosamente de modo a evitar o desprendimento de conídios. A solução foi trocada duas vezes durante dois dias. Em seguida, os discos foram fixados e conservados em solução de lactoglicerol, ácido láctico e água destilada (1:1:1 v/v/v).

A análise microscópica foi realizada com o auxílio de um microscópio óptico, binocular, no aumento de 400X (modelo FWL1500, Feldemann Wild Leite, Brasil). Para a visualização das estruturas do fungo, os discos foliares foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de Aman em lactofenol (ácido láctico, 10mL; glicerina, 10mL;

ácido fênico cristalizado 10g; azul de algodão, 0,1g e água destilada, 10mL).

A porcentagem de germinação e a formação de apressórios foram determinados em 100 conídios sobre os discos foliares. Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram a emissão de um tubo germinativo, independente do seu tamanho (Paulert, 2005). Para conídios germinados sem formação de apressório, determinou-se a frequência de tubos germinativos/conídio. Dos conídios germinados com apressório, avaliou-se a frequência de classes de conídios com um apressório, com um apressório mais um tubo germinativo e com mais de um apressório. Para conídios germinados com um único apressório classificou-se o comprimento dos tubos germinativo como curto ($\leq 10\mu\text{m}$) ou longo ($> 10\mu\text{m}$). Adicionalmente foi determinada em 250 conídios desenvolvidos sobre plântulas resistentes e suscetíveis tratadas com água ou ulvana as 48 HAI, a frequência de apressórios na superfície de células epidérmicas ou nas paredes anticlinais das células epidérmicas. Os conídios e as estruturas de infecção do fungo foram fotografados com uma câmera digital acoplada ao microscópio (5.1 mexapixels, modelo cyber-shot DSC-P93, Sony, Brasil).

5.8- Extração protéica e quantificação das proteínas

Para a obtenção do extrato protéico, utilizou-se o tecido remanescente da 2ª e 3ª folha expandida/plântula de acordo com metodologia adaptada de Brisset *et al.* (2000); Faize *et al.* (2006) e Hassan & Buchenauer (2007) às 24, 48 e 72 HAI. As folhas coletadas (Fig. 2) foram acondicionadas em papel alumínio e mantidas sob gelo e, em seguida, armazenadas a -20°C até o momento da extração protéica. As folhas foram maceradas usando-se cadinho e pistilo de porcelana na presença de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó. Na seqüência, as amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de sódio (50mM; pH 7,5) na proporção de 1:4 (p/v) contendo triton x-100 0,01% (Sigma-aldrich, USA), polivinilpolipirrolidona 1% (Sigma-aldrich, USA), ácido etilenodiaminotetracético 1mM (Sigma-aldrich, USA), fluoreto de fenilmetilsulfonila 1mM (Sigma-aldrich, China) e 2-mercaptoetanol 1mM (Sigma-aldrich, Japão). A suspensão foi transferida para microtubos de 2mL (Axygen, USA) e centrifugada a 20.000 g/30min a 4°C (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi recolhido e dividido em duas porções semelhantes contendo 1-2mL de extrato protéico. Uma porção foi armazenada a -20°C para posterior avaliação da atividade de glucanases, enquanto outra foi mantida sob

gelo por aproximadamente 3h para a avaliação imediata da atividade de proteínas totais e peroxidases.

O teor de proteínas totais foi determinado por meio do método de Bradford (1976). Para o preparo do reagente de Bradford adicionaram-se 25mg do corante azul de comassie 250 (Vetec, Brasil) em 12,5mL de etanol (95°GL). Em seguida adicionaram-se 25mL de ácido fosfórico (85%) e completou-se para 250mL com água destilada. Homogenizou-se a solução em agitador magnético na velocidade de 650rpm (modelo Q261-22, Quimis, Brasil) por 2h em capela e filtrou-se para utilização nos ensaios. Para quantificação foi construída a curva padrão de proteínas utilizando-se como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA, Sigma, USA), para o fornecimento da equação da reta utilizada nos cálculos de concentração das proteínas totais das amostras. Utilizaram-se 11 pontos distintos de concentrações de BSA variando de 0 a 19µg/38µl água (Anexo 15).

Para a avaliação da concentração de proteínas totais, adicionaram-se 38µL do extrato protéico, 962µL do reagente de Bradford em cubetas de quartzo (1mL). Após 2min a 24°C foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 595 nm. A concentração de proteínas, expressa em equivalentes de µg de BSA em 38µL do extrato protéico (µg de proteína/38µL da amostra) foi determinada utilizando-se a curva padrão de concentrações de BSA (Anexo 15).

5.9- Determinação da atividade de peroxidases

A atividade da peroxidases (POX) foi medida espectrofotometricamente conforme metodologia adaptada de Stadnik & Buchenauer (2000). Para tal, 100µL do extrato protéico foram adicionados em 2,9mL de tampão acetato de sódio (50mM; pH 5,5), contendo guaiacol 0,25% (v/v) (Sigma, EUA) e peróxido de hidrogênio 100mM (Merck, Alemanha). Os valores de absorbância da reação foram registrados a cada 30s durante 3min a 30°C por meio de um espectrofotômetro a 470nm (modelo 700 Plus, Femto, Brasil). Ao tubo correspondente ao 'branco', foi adicionado 100µL de tampão fosfato de sódio (50mM; pH 7,5) e 2,9mL de tampão acetato de sódio (50mM; pH 5,5) contendo guaiacol e peróxido de hidrogênio. A atividade de POX foi expressa em unidades de Densidade Óptica a 470nm/mg proteína/min.

5.10- Determinação da atividade de glucanases

A atividade de glucanases (GLU) foi determinada utilizando-se como substrato o composto 'carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante' (CM-curdlan-RBB, Loewe Biochemica, Alemanha), de acordo com metodologia adaptada de Wirth & Wolf (1992) e Brisset *et al.* (2000). Em microtubos de 2mL (Axygen, USA) foram adicionados 200 μ L de CM-curdlan-RBB (4,0 mg.mL⁻¹) e 200 μ L de tampão acetato de sódio (200mM; pH 5,0) que foram agitadas em vórtex na velocidade de 2111rpm por 5s (modelo AP56, Phoenix, Brasil) e incubadas à 40°C em banho-maria por 10min. Após a adição de 400 μ L de extrato foliar em cada microtubo a mistura foi agitada novamente em vórtex e então incubada a 40°C em banho-maria por 2h. As amostras tiveram suas reações interrompidas pela adição de 200 μ L de HCl 2N e mantidas no gelo por 10min. Findo este procedimento, as amostras foram centrifugadas por 10.000g/10min (modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha). As absorbâncias dos sobrenadantes das amostras foram determinadas a 600nm em espectrofotômetro (modelo 700 Plus, Femto, Brasil). Ao tubo correspondente ao 'branco' foram adicionados 200 μ L de CM-curdlan-RBB, 200 μ L de tampão acetato de sódio (200mM; pH 5,0), 400 μ L tampão fosfato de sódio (50mM; pH 7,5) e 200 μ L de HCl 2N. A atividade de GLU foi expressa em unidades de Densidade Óptica a 600nm/mg proteína/min.

5.11- Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi completamente casualizado, com 5 repetições/tratamento para as 24, 48 e 72 HAI. Foram verificadas a homogeneidade de variâncias de cada grupo de dados através do teste de Bartlett e os dados sofreram as devidas transformações para \sqrt{x} ou $\sqrt{x+1}$ quando necessário.

Na avaliação da severidade foram analisadas somente plântulas/plantas suscetíveis tratadas com água e ulvana. Plântulas/plantas resistentes foram descartadas da análise estatística, pois não apresentavam sintomas da MFG. Cada unidade experimental foi constituída de uma plântula/planta por vaso. Realizou-se análise de variância fatorial para os fatores posição de folhas e tratamento com ulvana. Quando se observou diferença significativa para os fatores ($p \leq 0,05$) foi realizado o teste-t para folhas superiores ou inferiores tratadas com ulvana comparado à testemunha.

Para avaliação da análise do processo infeccioso, cada unidade experimental foi constituída de quatro discos/plântula. Os dados foram submetidos separadamente à análise de variância para as 24, 48 e 72 HAI. Quando se observou diferença significativa pelo F-teste (5%), foi realizado o teste Tukey (5%) para a separação de médias. Adicionalmente para germinação de confídios utilizou-se análise de regressão ($p \leq 0,05$).

Na determinação da atividade de POX e GLU cada unidade experimental foi composta pelo tecido remanescente da 2^a e 3^a folhas expandidas/plântula. Os dados foram submetidos separadamente à análise de variância para as 24, 48 e 72 HAI. Quando se observou diferença significativa ($p \leq 0,05$) foi realizado o teste Tukey. Adicionalmente utilizou-se análise de regressão, quando se comparou a atividade da POX ou GLU entre os diferentes intervalos estudados.

Para as análises de variância foi utilizado software Statistica 6.0 – Stat Soft[®], versão 2001. O teste de regressão foi calculado através do software Sisvar (UFLA), versão 2001.

6- RESULTADOS

6.1- Efeito da ulvana sobre a severidade da MFG

6.1.1- Efeito em plântulas de macieira

Folhas superiores de plântulas foram mais suscetíveis a *C. gloeosporioides* do que as inferiores (Fig. 3 e 4). Pela análise de variância fatorial nos ensaios 1 e 2, os fatores posição de folhas e tratamento com ulvana apresentaram efeito significativo para as variáveis área foliar necrosada e AACPD. Porém, a interação entre posição de folhas x tratamento não foi significativa a 5% de probabilidade (Anexo 1). No ensaio 1, as folhas superiores das plântulas testemunhas apresentaram 6,2% de área foliar necrosada aos 10 DPI e 50,8 de AACPD. A pulverização de ulvana aos 6 DAI reduziu a área foliar necrosada em 49% e AACPD, em 38% (Fig. 3a, 3b, Anexo 2). Nas folhas inferiores, a área foliar necrosada das plântulas testemunhas foi de 2,5% e 17,7 de AACPD. Nestas folhas, a pulverização preventiva com ulvana não afetou a doença (Fig. 3a, 3b, Anexo 3).

No ensaio 2, as folhas superiores de plântulas testemunhas apresentaram 10,3% de área foliar necrosada aos 10 DPI e 65,7 de AACPD. A pulverização de ulvana aos 6 DAI reduziu a área foliar necrosada em 58% e AACPD, em 75% (Fig. 3c, 3d, Anexo 2). Nas folhas inferiores, a área foliar necrosada da MFG das plântulas testemunhas foi de 4,4% e 30,5 de AACPD. A pulverização preventiva com ulvana reduziu significativamente (teste-t, $p \leq 0,05$) a área foliar necrosada e AACPD em 75% nas folhas inferiores (Fig. 3c, 3d, Anexo 3).

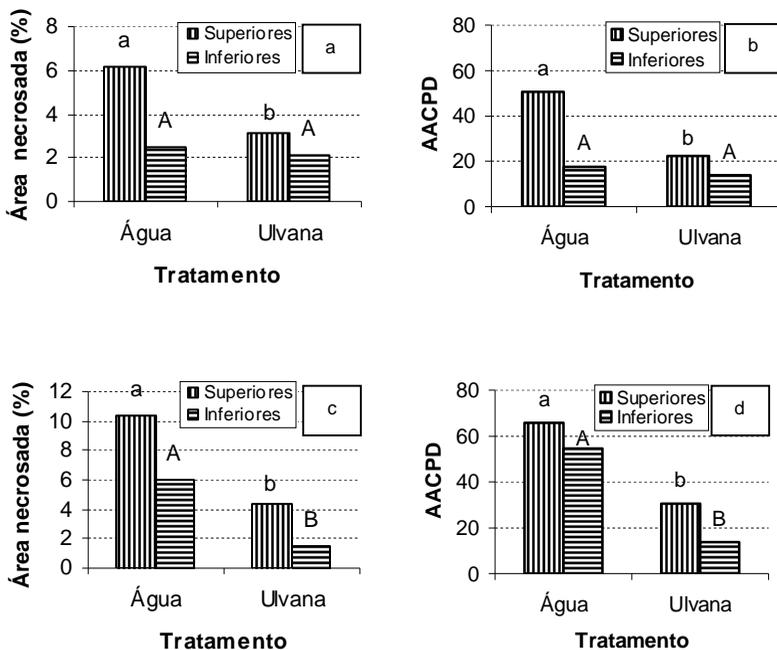


Figura 3: Efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (a, c) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (b, d) nas folhas superiores e inferiores de plântulas de macieira. Na análise estatística os dados foram transformados para raiz $(x)+1$. Colunas com mesmas letras minúsculas e maiúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$) quanto ao efeito sobre folhas superiores e inferiores, respectivamente. Ensaios 1 (a, b) e 2 (c, d).

6.1.2- Efeito em plantas de macieira

Folhas superiores de plantas foram mais suscetíveis a *C. gloeosporioides* do que as inferiores (Fig. 4). Pela análise de variância fatorial, os fatores posição de folhas e tratamento com ulvana apresentaram efeito significativo para as variáveis área foliar necrosada e AACPD. Porém, a interação entre posição de folhas x tratamento não foi significativa ($p \leq 0,05$) (Anexo 1). As folhas superiores das plantas testemunhas apresentaram 26,5% de área foliar necrosada aos 10 DPI e 138 de AACPD. A pulverização de ulvana aos 6 DAI reduziu a área foliar necrosada em 63% e AACPD, em 52% (Fig. 4a, 4b, Anexo 2). Nas folhas inferiores, a área foliar necrosada das plantas testemunhas foi de 15% e 99,5 de AACPD. A pulverização preventiva com ulvana das folhas inferiores reduziu em 52% a área foliar necrosada e em 37% a AACPD, comparado à testemunha pelo teste-t a 5% de probabilidade (Fig. 4a, 4b, Anexo 3).

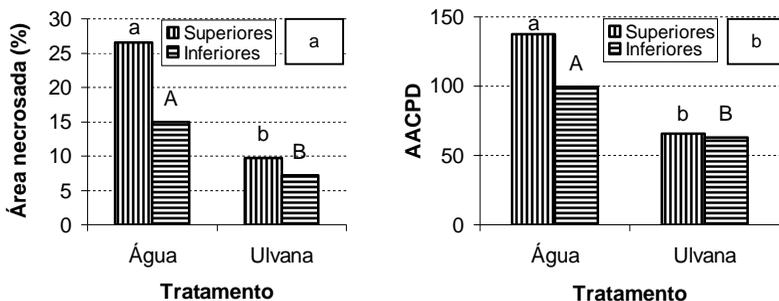


Figura 4: Efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* (a) e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) (b) nas folhas superiores e inferiores de plantas de macieira. Na análise estatística os dados foram transformados para raiz (x). Colunas com mesmas letras minúsculas e maiúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste t ($p \leq 0,05$) quanto ao efeito sobre folhas superiores e inferiores, respectivamente.

6.2- Efeito de ulvana sobre a germinação e desenvolvimento de estruturas de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides*

6.2.1- Efeito sobre a germinação de conídios

A porcentagem de conídios germinados em plântulas testemunha às 24, 48 e 72 HAI foi de 72, 61 e 85%, respectivamente. A germinação em plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI foi de 65, 78 e 70%, enquanto que em plântulas resistentes foi de 66, 62 e 41%, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Fig. 5 e 6a). Pela análise de regressão não houve diferença estatística para a germinação de conídios entre os diferentes intervalos analisados (Anexo 4). Porém, quando se comparou os tratamentos às 72 HAI, a germinação de conídios em plântulas resistentes foi 62% inferior àquela da testemunha (Fig. 5, Anexo 5). Às 24 e 48 HAI, não houve diferença estatística entre os tratamentos pela análise de variância (Anexo 5).

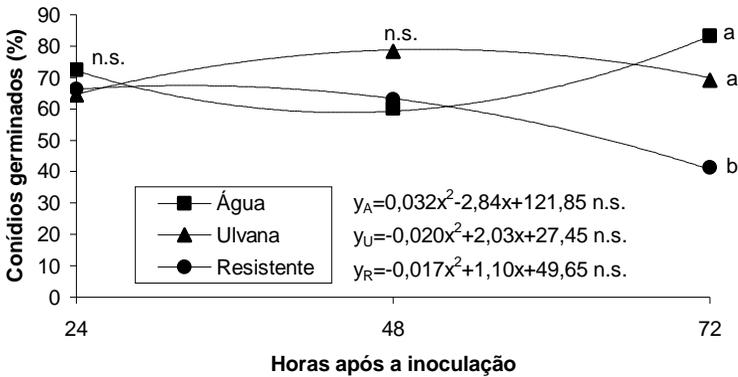


Figura 5: Germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Pontos com mesmas letras minúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). n.s.=Não significativo. N.S.= Não significativo pela análise de variância do modelo de regressão quadrático.

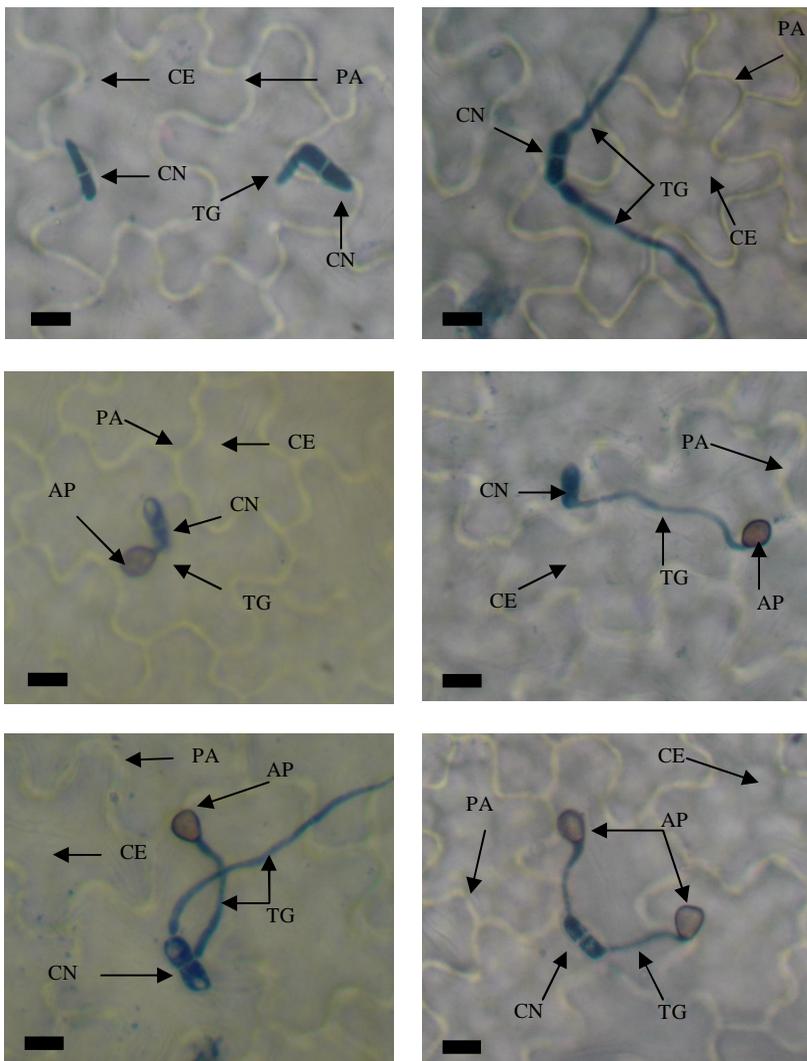


Figura 6: Conídios e estruturas de infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* desenvolvidos na superfície adaxial de folhas de macieira resistentes e suscetíveis tratadas com água ou ulvana 48 horas após a inoculação. (a) Conídio não germinado e conídio germinado com um tubo germinativo; (b) Conídio com dois tubos germinativos; (c) Conídio com um apressório com tubo germinativo curto ($\leq 10\mu\text{m}$) na

superfície da célula epidérmica; (d) Conídio com um apressório com tubo germinativo longo ($>10\mu\text{m}$) na parede anticlinal; (e) Conídio com um apressório na parede anticlinal e mais um tubo germinativo; (f) Conídio com dois apressórios sobre paredes anticlinais. CN = Conídio; TG = Tubo germinativo; AP = Apressório; CE = Células epidérmicas; PA = Paredes anticlinais das células epidérmicas. Barras = $10\mu\text{m}$.

6.2.2- Efeito sobre a germinação de conídios sem apressório

A porcentagem de conídios germinados que não formaram apressório em plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI foi de 18, 12 e 8%, respectivamente. A pulverização de ulvana aumentou significativamente a porcentagem de conídios germinados sem apressório em 122, 175 e 363% às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente, quando comparado à testemunha. A formação de apressórios sobre plântulas resistentes não diferiu da testemunha a 5% de probabilidade (Fig. 7, Anexos 6, 7).

A classe mais freqüente (90%) de conídios germinados sem apressório foi composta por aqueles conídios que tinham somente um tubo germinativo (Fig. 6a). Plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI exibiram maior porcentagem de conídios com somente um tubo germinativo. Plântulas resistentes não diferiram da testemunha (Fig. 7, Anexos 6, 7).

A classe menos freqüente (10%) de conídios germinados sem apressório englobou aqueles conídios que apresentavam mais de um tubo germinativo (Fig. 6b), não havendo diferença estatística entre os tratamentos pela análise de variância, nos três momentos avaliados (Fig. 7, Anexo 6).

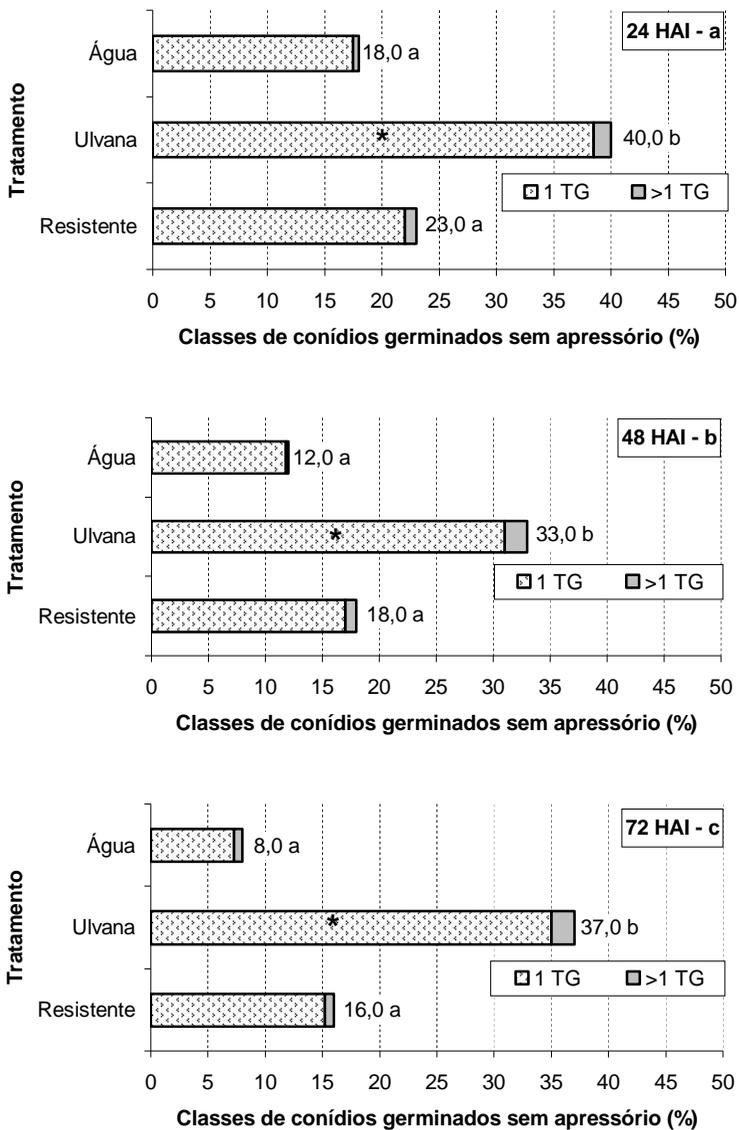


Figura 7: Frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* sem apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e

resistentes às 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas após a inoculação (HAI). Classes com: um tubo germinativo (1TG), mais de um tubo germinativo (>1TG). Barras com mesmas letras minúsculas indicam que não há diferença estatística para número total de conídios germinados sem apressório pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). *Indica diferença significativa em relação à testemunha.

6.2.3- Efeito sobre a germinação de conídios com apressório

A porcentagem de conídios germinados que formaram apressório em plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI foi de 82, 88 e 92%, respectivamente. A pulverização de ulvana reduziu drasticamente a porcentagem de conídios germinados com apressório em 37, 31 e 46%, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente, quando comparado à testemunha. A formação de apressórios sobre plântulas resistentes não diferiu da testemunha a 5% de probabilidade (Fig. 8, Anexos 8 e 9)

A classe mais freqüente (93%) de conídios germinados com apressório foi composta por aqueles conídios que tinham somente um apressório (6c e 6d). Plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI exibiram menor porcentagem de conídios com somente um apressório. Plântulas resistentes não diferiram da testemunha (Fig. 8, Anexos 10 e 11).

A classe de segunda maior freqüência (6%) de conídios germinados com apressório envolveu aqueles conídios que formaram apressório mais um tubo germinativo (6e). Às 48 HAI, plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI exibiram maior porcentagem de conídios com formação de apressório mais um tubo germinativo, quando comparado à testemunha. Às 24 e 72 HAI, não se observou diferença estatística entre os tratamentos pela análise de variância (Fig. 8, Anexos 10 e 11).

A classe menos freqüente (1%) de conídios germinados com apressório englobou aqueles que apresentavam mais de um apressório (6f), não havendo diferença significativa entre os tratamentos pela análise de variância, nos três momentos avaliados (Fig. 8, Anexo 10).

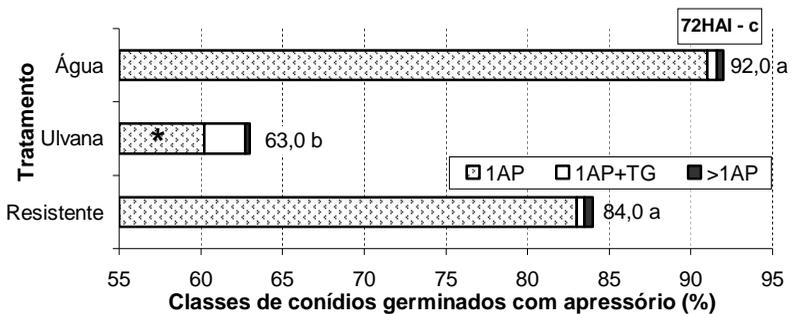
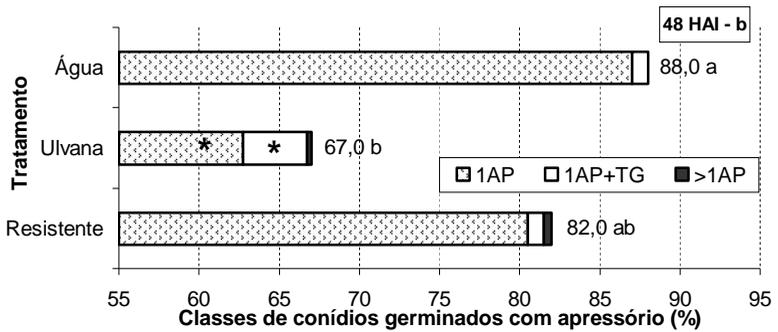
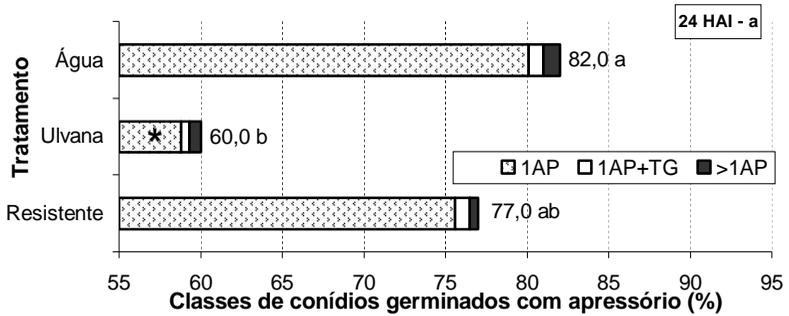


Figura 8: Frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e

resistentes às 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas após a inoculação (HAI). Classes com: um apressório (1AP), um apressório e um tubo germinativo (1AP+1TG), mais de um apressório (>1AP). Barras com mesmas letras minúsculas indicam que não há diferença estatística para número total de conídios germinados com apressório pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). *Indica diferença significativa em relação à testemunha.

6.2.4- Efeito sobre o comprimento do tubo germinativo de conídios com um único apressório

De 85 a 90% dos conídios germinados com um único apressório de plântulas testemunhas e resistentes apresentaram tubo germinativo curto (Fig. 6c). Plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI exibiram entre 55 e 65% dos conídios com tubo germinativo curto (Fig. 9). Plântulas tratadas com ulvana apresentaram menor porcentagem de conídios com tubo germinativo curto (Fig. 9, Anexos 12 e 13)

De 10 a 15% dos conídios germinados com um único apressório em plântulas testemunhas e resistentes exibiram tubo germinativo longo (Fig. 6d). Plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI exibiram entre 35 e 45% dos conídios classificados com tubo germinativo longo (Fig. 9). Plântulas tratadas com ulvana apresentaram maior porcentagem de conídios com tubo germinativo longo (Fig. 9, Anexos 12 e 13).

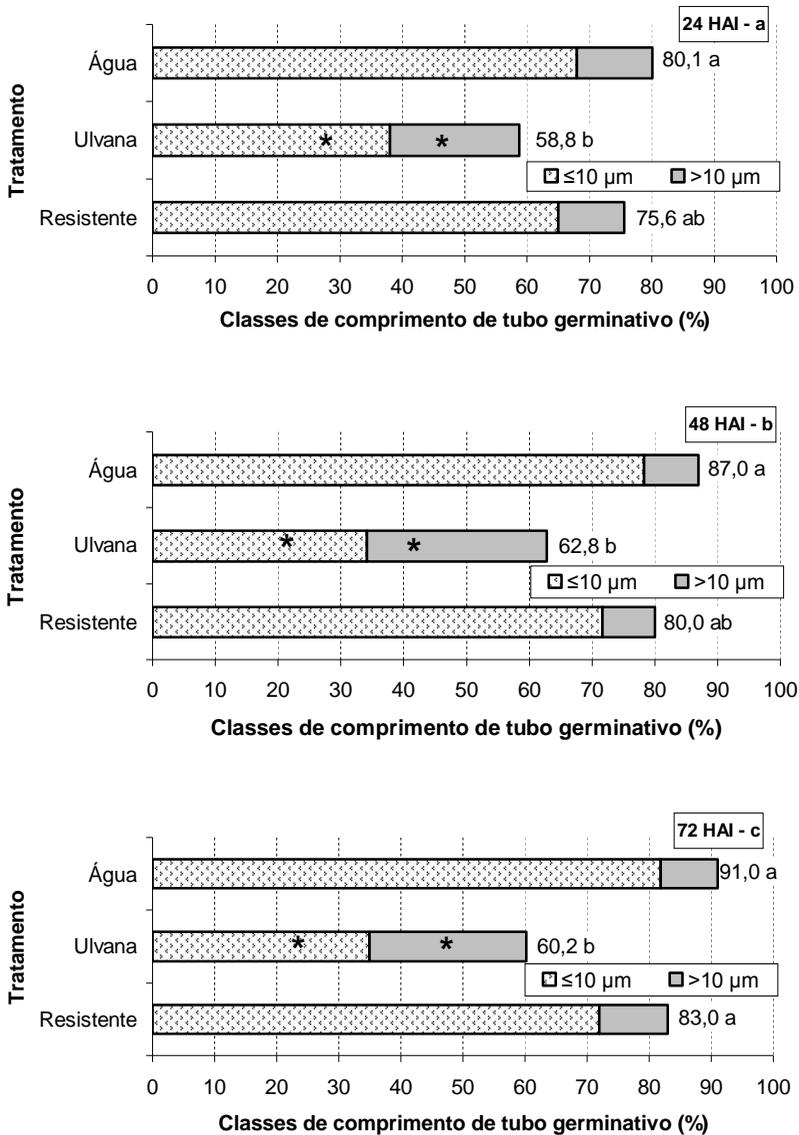


Figura 9: Frequência das classes de comprimento de tubo germinativo de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com um único apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira

suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24 (a), 48 (b) e 72 (c) horas após a inoculação (HAI). Classes com: tubo germinativo curto ($\leq 10 \mu\text{m}$) e longo ($> 10 \mu\text{m}$). Barras com mesmas letras minúsculas indicam que não há diferença estatística para número total de conídios germinados com único apressório pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). *Indica diferença significativa em relação à testemunha.

6.2.5- Localização de apressórios na epiderme

Dos 250 conídios germinados sobre plântulas resistentes e suscetíveis tratadas com água ou ulvana, em média 27% desenvolveram apressório na superfície das células epidérmicas (Fig. 6c), enquanto 73% destes formaram apressório nas paredes anticlinais das células epidérmicas (Fig. 6d). Pelo teste-t a 5% de probabilidade a maior parte dos conídios de *C. gloeosporioides* formaram apressório nas paredes anticlinais das células epidérmicas (Tab. 3, Anexo 14).

Tabela 3: Localização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a epiderme de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes 48 horas após a inoculação.

Tratamentos	Frequência da localização de apressórios na epiderme sobre:	
	Células epidérmicas (%)	Paredes anticlinais das células epidérmicas (%)
Água	25	75
Ulvana	18	82
Resistente	37	63
Média	27 a	73 b

CN = Conídio; CE = Células epidérmicas; PA = Paredes anticlinais das células epidérmicas. n.s.=Não significativo.

6.3- Quantificação de proteínas totais em plântulas

Pelo método de Bradford, plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI apresentaram 17,1, 17,4 e 24,7 μg de proteína/38 μL de extrato protéico, respectivamente. A quantidade de proteínas totais em plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI foi de 10,8, 14,2 e 16,8, enquanto que em plântulas resistentes foi de 13,2, 20,2 e 23,8 μg de proteína/38 μL de

extrato protéico às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Tab.4). Não houve diferença estatística entre os tratamentos pela análise de variância (Tab.4, Anexo 16).

Tabela 4: Quantificação de proteínas totais em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) com *Colletotrichum gloeosporioides*.

Tratamento	Proteína total		
	Δ Abs 595nm/ μ g proteína/38 μ L		
	24 HAI	48 HAI	72 HAI
Água	17,1 n.s.	17,4 n.s.	24,7 n.s.
Ulvana	10,8	14,2	16,8
Resistente	13,2	20,2	23,8

Na análise estatística os dados foram transformados para raiz (x). n.s.= Não significativo pela análise de variância ($p \leq 0,05$)

6.4- Atividade de peroxidases em plântulas

A atividade de POX em plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI foi de 1,54; 4,58 e 1,21 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, respectivamente. A atividade em plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI foi de 2,44, 5,76 e 4,27, enquanto que em plântulas resistentes foi de 5,84, 4,99 e 4,16 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Fig. 10). A análise de regressão revelou diferença estatística na atividade da POX entre os diferentes intervalos analisados para plântulas testemunhas e tratadas com ulvana. Entretanto, para plântulas resistentes a análise de regressão não foi significativa (Fig. 10, Anexo 17).

A atividade de POX em plântulas resistentes 24 HAI foi 279% maior que das testemunhas. Plântulas tratadas com ulvana não diferiram das testemunhas. Às 48 HAI não houve diferença estatística entre os tratamentos (Anexo 18). A atividade de POX às 72 HAI de plântulas tratadas com ulvana e resistentes foi de 253% e 244%, respectivamente, maior que aquela registrada nas plântulas testemunhas (Fig. 10, Anexos 18 e 19).

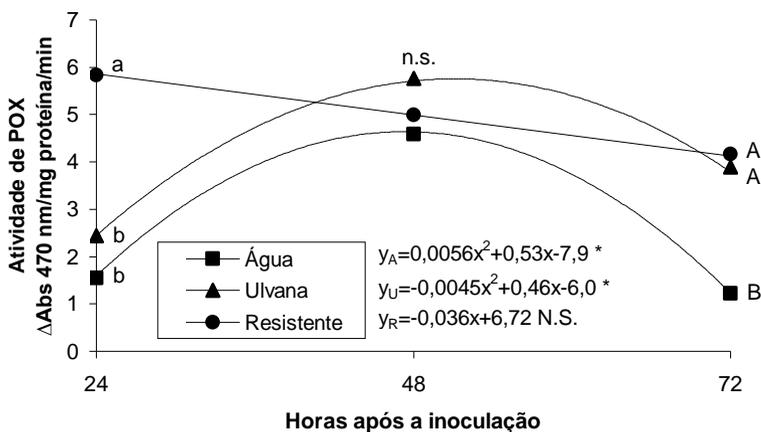


Figura 10: Atividade de peroxidases (POX) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*. Pontos com mesmas letras minúsculas e maiúsculas indicam que não há diferença estatística pelo teste Tukey ($p \leq 0,05$). n.s.=Não significativo. *Indica diferença significativa pela análise de variância do modelo de regressão linear ou quadrático, enquanto N.S. é não significativo.

6.5- Atividade de glucanases em plântulas

A atividade de GLU em plântulas testemunhas às 24, 48 e 72 HAI foi de 4,01, 2,31 e 2,82 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, respectivamente. A atividade em plântulas pulverizadas com ulvana 6 DAI foi de 4,32, 3,18 e 3,10, enquanto que em plântulas resistentes foi de 5,71, 2,78 e 3,66 unidades de densidade óptica/mg de proteína/min, às 24, 48 e 72 HAI, respectivamente (Fig. 11). A análise de regressão revelou diferença estatística na atividade da GLU entre os diferentes intervalos analisados para plântulas tratadas com ulvana. Entretanto, para plântulas testemunhas e resistentes a análise de regressão não foi significativa (Fig. 11, Anexo 20).

A atividade máxima de GLU foi verificada às 24 HAI. Porém, não houve diferença estatística entre os tratamentos em nenhum dos momentos pela análise de variância (Fig. 11, Anexo 21)

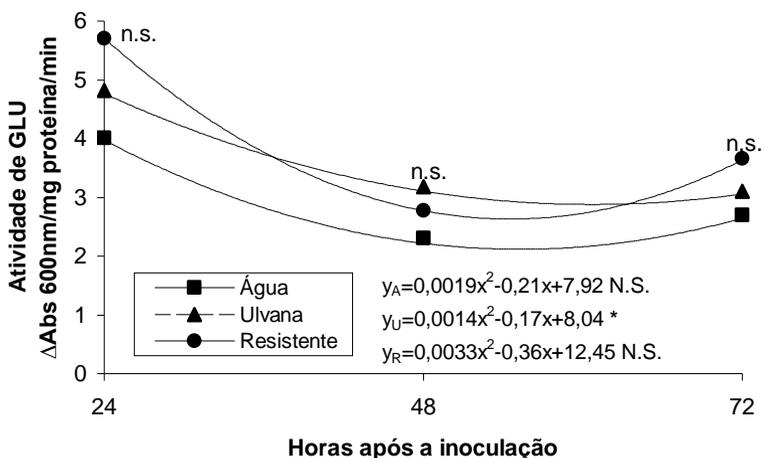


Figura 11: Atividade de glucanases (GLU) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*. n.s.=Não significativo a 5% de probabilidade. *Indica diferença significativa pela análise de variância do modelo de regressão quadrático, enquanto N.S. é não significativo.

7- DISCUSSÃO

Plântulas/plantas resistentes inoculadas com *C. gloeosporioides* nunca apresentaram sintomas da MFG, confirmando que a reação observada nos segregantes resistentes é de caráter monogênico recessivo (Dantas *et al.*, 2009). A resistência monogênica caracteriza-se por ter uma distribuição descontínua no fenótipo, de tal modo que indivíduos resistentes podem ser facilmente distinguidos dos suscetíveis (Camargo, 1995).

A severidade da MFG foi mais intensa em plantas com 5 meses de idade (Ensaio 3) que em plântulas com 3 meses (Ensaio 1 e 2), apesar de ambas terem sido inoculadas da mesma forma e com a mesma concentração de *C. gloeosporioides*. Para essa maior severidade de doença no ensaio 3, os seguintes fatores podem ter contribuído: estágio fenológico da planta mais suscetível, maior agressividade do isolado e/ou temperatura mais favorável de incubação.

Quanto ao estágio fenológico, sabe-se que folhas novas de macieira são mais suscetíveis à infecção de *C. gloeosporioides* (Araújo *et al.*, 2008). No presente trabalho, a severidade da MFG foi mais intensa em folhas superiores (mais novas), comparado as inferiores (mais velhas). No entanto, a idade da planta parece não interferir na severidade da MFG, desde que plantas tenham folhas novas (Guerra, 2007). Apesar disso, em outros patossistemas envolvendo *Colletotrichum* spp. tem se observado diferença de suscetibilidade em função do estágio fenológico (Bentes & Matsuoka, 2002; Costa *et al.*, 2006). Por isso, não se pode descartar a hipótese de que a idade da macieira possa ter influenciado o nível de resistência da plântula.

Isolados de fungos fitopatogênicos podem apresentar variabilidade de agressividade em diferentes patossistemas, incluindo *Colletotrichum* sp. (Balardin, 1997; Pereira *et al.*, 2006, Andrade *et al.*, 2007). No atual estudo, para a inoculação de plântulas e plantas, utilizaram-se os isolados de *C. gloeosporioides* MANE147 e CGF1, respectivamente, provenientes de regiões distintas. Até o momento não há relato de raças e/ou diferença de agressividade para diferentes isolados de *C. gloeosporioides*. Isso é, contudo possível, visto que o fungo possui uma grande variabilidade genética (Gonzales *et al.*, 2004; Hamada, 2005b; Gonzales *et al.*, 2006).

A temperatura é a variável meteorológica de maior importância no estabelecimento e progresso da MFG (Boneti *et al.*, 2004). Sabe-se que plantas de macieira inoculadas com *C. gloeosporioides* e mantidas a 28°C apresentam sintomas da MFG a partir das 45 HAI (Becker *et al.*,

2000). Crusius *et al.* (2002) verificaram no entanto, que à medida que a temperatura ambiente é reduzida de 28 para 14°C, a severidade da MFG diminui drasticamente em plantas de macieira. Considerando que a temperatura de incubação foi mais favorável ao patógeno no ensaio 3, isso provavelmente explicaria a maior severidade da MFG nesse ensaio.

A pulverização preventiva de ulvana em folhas superiores de plântulas/plantas de macieira reduziu significativamente a severidade da MFG (Fig. 3 e 4). A ulvana foi efetiva no controle da MFG, tanto em condições de baixa (Ensaio 1 e 2) e alta intensidade (Ensaio 3) de doença. Este resultado é semelhante ao obtido por Araújo *et al.* (2008), os quais realizaram pulverizações de ulvana em plântulas de macieira aos 6 DAI com *C. gloeosporioides* e encontraram redução da severidade local e sistêmica da MFG em torno de 65%. A aplicação preventiva de ulvana tem demonstrado potencial para o controle de doenças em outras espécies cultivadas, tais como feijoeiro contra a antracnose (Fernandes, 2007; Paulert *et al.*, 2009) e a ferrugem (Borsato, 2009). Considerando que a ulvana não tem efeito direto sobre fungos e que pode estimular respostas de defesa local e sistêmico na planta (Cluzet *et al.*, 2004; Araújo *et al.*, 2008; Paulert *et al.*, 2009), pode-se sugerir que o polissacarídeo possa ter induzido resistência nas plântulas/plantas. A resistência induzida do hospedeiro a fitopatógenos tem a capacidade de reduzir o número e tamanho das lesões, controlando a severidade de doenças em plantas (Stadnik & Maraschin, 2004).

A pulverização preventiva de ulvana em folhas inferiores de macieira reduziu significativamente a severidade da MFG nos ensaios 2 e 3 (Fig. 3 e 4). Contudo, no ensaio 1 a pulverização de ulvana não afetou significativamente a doença (Anexo 3). Uma provável explicação para a discrepância dos resultados do ensaio 1 seria que, além da baixa severidade (testemunha 2,1%), as folhas inferiores são mais resistentes a MFG (Araújo *et al.*, 2008), determinando baixa intensidade da doença e impossibilitando a verificação de efeitos.

Pela análise de regressão, a resistência inata não afetou a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* sobre os tecidos de macieira até 72 HAI (Anexo 4). Em geral, conídios de *Colletotrichum* spp. germinam tão bem na superfície de cultivares resistentes quanto em suscetíveis (Wharton *et al.*, 2001; Bentes & Matsuoka, 2002). Porém, no atual estudo, quando se comparou os tratamentos às 72 HAI, a germinação de conídios em plântulas resistentes foi inferior à testemunha (Fig. 5, Anexo 5). Uma provável explicação para esta discrepância de resultados seria que, os tecidos às 72 HAI por serem

mais velhos e em plântulas resistentes, poderiam suportar uma maior população de residentes do filoplano (Kinkel, 1997). Estes residentes poderiam por sua vez inibir a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* retardatários que são geralmente mais fracos (O'Connell *et al.*, 2000).

A superfície foliar de plantas é um habitat natural para microrganismos, sendo que muitos deles apresentam, ou podem apresentar, potencialidade como agentes de controle biológico de patógenos (Bettiol & Ghini, 2004). Em frutos e folhas de macieira tem se listado diversos residentes do filoplano que podem inibir o desenvolvimento de *Colletotrichum* sp. (Rolleberg, 2008). Folhas mais velhas exibem maior concentração de nutrientes que contribuem para o maior estabelecimento de microrganismos do filoplano (Kinkel, 1997). A disponibilidade de nutrientes em especial açúcares simples, é o principal determinante para a colonização do filoplano (Lanna, 2008). Plantas de uma mesma espécie mantidas no mesmo local podem apresentar diferentes populações do filoplano, devido a diferenças na característica da folha (Kinkel, 1997). No presente estudo, plântulas de macieira suscetíveis são do grupo 'Gala', enquanto que resistentes do grupo 'Fuji'. Coincidentemente, frutos de maçã 'Fuji' contém em geral mais açúcares solúveis que a 'Gala' (Argenta, 2002).

A pulverização de ulvana não afetou a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* sobre a epiderme de folhas de macieira (Fig. 5). Estudos em outros patossistemas têm também revelado que a ulvana não afeta a germinação de esporos de outros fungos, tais como *U. appendiculatus* em feijoeiro (Borsato, 2009). A resistência induzida por indutores bióticos e abióticos parece não influenciar a germinação de esporos (Stadnik & Buchenauer, 2000). No entanto, Fernandes (2007) encontrou redução da germinação de *C. lindemuthianum* em feijoeiro tratado com ulvana, e atribuiu esse efeito a um eventual seqüestro de cátions pelo polissacarídeo e/ou aumento da população do filoplano que inibiu o desenvolvimento do patógeno.

A formação de apressórios e o alongamento do tubo germinativo de *C. gloeosporioides* em plântulas resistentes ocorreu de forma semelhante àqueles observados em plântulas testemunha (Fig. 7, 8 e 9). Os eventos iniciais de penetração são os mesmos em cultivares suscetíveis e resistentes. Conídios emitem tubos germinativos, que formam apressórios globosos e melanizados, e que por sua vez emitem hifas de penetração que infectam diretamente células da epiderme

(Wharton *et al.*, 2001; Bentes & Matsuoka, 2002; Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004).

A pulverização de ulvana aos 6 DAI inibiu a formação de apressórios (Fig. 7 e 8) e favoreceu o alongamento do tubo germinativo de *C. gloeosporioides* (Fig. 9). Este efeito sobre a penetração de *C. gloeosporioides* pode ter sido direto e/ou indireto, já que a ulvana pode estimular respostas de defesa sistêmica em macieira (Araújo *et al.*, 2008). Como efeito direto a ulvana poderia ter formado quelatos com o cálcio que inibiram a diferenciação do apressório (Deising *et al.*, 2000; Tucker & Talbot 2001). No entanto, para efeito indireto a ulvana pode ter incrementado a população de microorganismos da filosfera (Kinkel, 1997), e/ou induziu resistência nas plântulas de macieira (Araújo *et al.*, 2008) o que poderia explicar estes resultados.

Em *Colletotrichum* spp, a diferenciação do tubo germinativo em apressório envolve complexos processos morfogenéticos que são influenciados por sinais químicos e/ou físicos. Os sinais químicos necessários podem ser: potássio, íons de cálcio, açúcares simples, monômeros de cera, etileno, gradientes de pH e mudanças de temperatura. Os sinais físicos são impostos pela superfície do hospedeiro como: hidrofobicidade, rigidez, componentes da superfície da planta e propriedades topográficas da planta (Mendgen *et al.*, 1996, Deising *et al.*, 2000). Após o contato do fungo com a superfície do hospedeiro, inicia-se uma cadeia de eventos moleculares que ativam genes necessários à diferenciação do apressório (Deising *et al.*, 2000). O Ca^{2+} é responsável pela ativação de quinases que fosforilaram diretamente fatores de transcrição e de mediação da ativação desses genes de diferenciação (Deising *et al.*, 2000; Tucker & Talbot 2001). Tem-se demonstrado *In vitro* que a adição de quelatos restringe a participação do Ca^{2+} na sinalização dos genes de diferenciação, inibindo a germinação de conídios e a formação de apressórios de *C. gloeosporioides*. No entanto, a formação de apressórios é mais sensível a restrição de Ca^{2+} do que a germinação (Kolattukudy *et al.*, 2000). A ulvana é um polissacarídeo com capacidade de formar quelatos na presença de íons boro e cálcio (Chiovitti *et al.*, 2001). Fernandes (2007) já havia levantado a hipótese que a pulverização de ulvana em plantas de feijoeiro poderia ter favorecido a formação de quelatos com o cálcio, reduzindo a germinação de *C. lindemuthianum*. Se futuramente comprovado, esta capacidade da ulvana interferir na diferenciação de estruturas de infecção de *C. gloeosporioides* revela um novo modo de ação para o controle da MFG, semelhante aos descritos por Percival &

Boyle (2009) com o uso de polímeros sintéticos para o controle da sarna em macieira.

A ulvana é um polissacarídeo que pode aumentar o crescimento micelial e a germinação de conídios *in vitro* (Paulert *et al.*, 2009), sendo assim, a ulvana pode fornecer nutrientes aos microrganismos que estão no filoplano. Fernandes (2007) sugeriu que a pulverização de ulvana em plantas de feijoeiro aumentou a população de residentes do filoplano, que provavelmente inibiram a germinação de *C. lindemuthianum*. Na cultura do citros, *Bacillus* spp. que são residentes do filoplano inibem, por exemplo, o crescimento micelial de *C. acutatum*, e podem ser utilizados no controle biológico da doença (Kupper *et al.*, 2003).

A resistência induzida por indutores bióticos e abióticos pode influenciar, com exceção da germinação de esporos, as demais fases do desenvolvimento de fungos (Stadnik & Buchenauer, 2000). A aplicação de ácido salicílico em feijoeiro estimula, por exemplo, a síntese de PR-1 que inibe a diferenciação da hifa infectiva de *U. fabae* (Pers.) de Bary (Rauscher *et al.*, 1999). Tem-se demonstrado *In vitro* que a adição de PR1 reduz a diferenciação do apressório de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary (van Loon *et al.*, 2006) e *U. fabae* (Rauscher *et al.*, 1999). A síntese de PR-1 em plantas tem sido relacionada a anomalias morfológicas nas estruturas de infecção de fungos (Ryals *et al.*, 1994; Rauscher *et al.*, 1999; van Loon *et al.*, 2006). Coincidentemente, tem sido relatado que plantas de *Arabidopsis thaliana* Wildtype Col. (Stadnik *et al.*, 2009c) e *Medicago truncatula* L. (Cluzet *et al.*, 2004) pulverizadas preventivamente com ulvana apresentam uma expressão rápida e mais intensa de PR-1.

A inibição da formação de apressórios e alongamento do tubo germinativo de *C. gloeosporioides* podem estar correlacionados com a redução e atraso da severidade da MFG em plântulas de macieira pulverizadas preventivamente com ulvana (Fig. 3). Os apressórios são essenciais para que o fungo possa penetrar diretamente na cutícula e a parede celular do hospedeiro (Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004). Assim, a redução sua formação em *Colletotrichum* spp. resulta em menor severidade da antracnose em diferentes patossistemas (Bentes & Matsuoka, 2002; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005). No entanto, maior alongamento do tubo germinativo de *C. acutatum* tem sido relacionado a um atraso do aparecimento de sintomas da doença em folhas de amêndoa (Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005).

A classe mais freqüente ($\geq 90\%$) de conídios germinados com e sem apressório sobre plântulas com resistência inata e induzida foi

composta por aqueles conídios que tinham somente um tubo germinativo (Fig. 7 e 8). Este resultado sugere que *C. gloeosporioides* emite apenas um tubo germinativo para infectar o hospedeiro, e caso o fungo não consiga penetrar, pode tentar formar um segundo tubo. Geralmente, devido ao enfraquecimento nutricional do fungo e à sensibilização das reações de defesa da planta à infecção, este segundo tubo germinativo também irá falhar na penetração (O'Connell *et al.*, 2000; Stadnik & Mazzafera, 2000). De modo geral, uma infecção bem sucedida de *Colletotrichum* spp. ocorre com a deposição de conídios na superfície das folhas, diferenciação de um tubo germinativo em apressório, seguido da penetração e colonização nas células epidérmicas (Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004).

A maior parte dos conídios germinados sobre plântulas testemunhas formaram apressório nas paredes anticlinais das células epidérmicas (Tab. 3). Assim, poderia se pensar que a colonização do *C. gloeosporioides* em macieira, seja do tipo intramural subcuticular necrotrófica, devido à localização dos apressórios e o curto período de latência da MFG. Neste tipo de colonização, a hifa infectiva a qual emerge a partir do poro do apressório se desenvolve sob a cutícula nas paredes periclinais e anticlinais das células epidérmicas (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2005). A maior parte de *Colletotrichum* spp. coloniza o hospedeiro através da interação intracelular hemibiotrófica, porém, para algumas espécies tem sido relatada a interação subcuticular intramural necrotrófica (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005).

Na colonização intramural subcuticular necrotrófica, a interação é em grande parte necrotrófica e a fase biotrófica é muito curta, ou mesmo, não ocorre (Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004). Plantas de macieira inoculadas com *C. gloeosporioides* podem apresentar sintomas da MFG cerca de 45 HAI (Becker *et al.*, 2000). No patossistema *C. lindemuthianum* e feijoeiro, a colonização do fungo é do tipo intracelular hemibiotrófica, sendo que a fase biotrófica tem duração de até 72h (Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005). Plantas de feijoeiro inoculadas com *C. lindemuthianum* apresentam sintomas da antracnose somente a partir de 5 DPI (Paulert, 2005).

Neste estudo de localização de apressório na epiderme foi verificado que uma menor parte dos conídios de *C. gloeosporioides* formaram apressórios na superfície das células epidérmicas (Tab. 3). Na colonização intracelular hemibiotrófica, a hifa infectiva a qual emerge a

partir do poro do apressório se desenvolve sob células epidérmicas (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005; Peres *et al.*, 2005). *Colletotrichum* spp podem colonizar plantas através da interação intracelular hemibiotrófica e/ou intramural subcuticular necrotrófica, dependendo do hospedeiro, tecido e cultivares com diferente intensidade de resistência (Mendgen & Hahn, 2002; Wharton & Diéguas-Uribeondo, 2004; Diegues-Uribeondo *et al.*, 2005). Por isso, não se pode descartar que *C. gloeosporioides* possa colonizar os tecidos de macieira através das duas estratégias de colonização. No entanto, é importante se destacar que no presente estudo não se observou a colonização intramural, já que a técnica utilizada não permitia fazer este tipo de aferição. Assim, são necessários novos estudos para confirmar a colonização intramural subcuticular necrotrófica neste patossistema.

Um dos mecanismos de defesa mais comuns e eficientes que são ativados após o reconhecimento de patógenos é a síntese das proteínas relacionadas à patogênese (Ryals *et al.*, 1994; Metraux, 2001). A POX e GLU estão no grupo das proteínas de patogênese (van Loon *et al.*, 2006) e podem estar envolvidas nos mecanismos de resistência posteriores à penetração de *C. gloeosporioides* em macieira.

Plântulas com resistência inata apresentaram maior atividade de POX às 24 e 72 HAI, comparado às testemunhas. O pico da POX em plântulas resistentes ocorreu às 24 HAI (Fig. 10). No atual estudo, pode-se sugerir que o rápido aumento da atividade da POX foi preponderante para interferir na infecção de *C. gloeosporioides* em plântulas resistentes, associado a um provável reforço da parede celular.

Plantas resistentes reconhecem a presença do patógeno rapidamente e ativam seus mecanismos de defesa que são eficientes contra a invasão. Em plantas suscetíveis, o patógeno é freqüentemente reconhecido mais tarde e a planta pode ser infectada (Metraux, 2001; Wharton *et al.*, 2001). Em cana-de-açúcar, plantas resistentes a podridão vermelha apresentam maior atividade de peroxidases, comparado às suscetíveis às 24 HAI, controlando a infecção de *C. falcatum* (Asthir *et al.*, 2009). POX catalizam a oxidação e eventual polimerização de álcool hidrocínâmico, na presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), originando a lignina, que juntamente com a celulose e outros polissacarídeos que se acumulam na parede celular das células vegetais, funcionam como uma barreira física à penetração fúngica (Stadnik & Buchenauer, 2000). A rápida lignificação da parede celular de plantas resistentes sob o apressório de *Colletotrichum* spp. é um dos

mecanismos de defesa primordiais para evitar a penetração do fungo em seus tecidos (Hammerschmidt & Kuc, 1982). Plantas de pepino com resistência inata controlam a infecção por *C. lagenarium* (Pass.) Ellis et Halsted, associado ao maior acúmulo de lignina na parede celular às 24 HAI (Hammerschmidt & Kuc, 1982).

A atividade de POX em plântulas tratadas com ulvana às 72 HAI foi 253% maior em relação às testemunhas (Fig. 10). O aumento significativo dessa enzima, não deve ter contribuído possivelmente para inibição da infecção de *C. gloeosporioides*, devido o curto período de latência da MFG. No entanto, o aumento da POX às 72 HAI poderia interferir na colonização do fungo, conforme descrito em outros patossistemas (Brisset *et al.*, 2000; Hassan & Buchenauer, 2007). A pulverização preventiva de acibenzolar em plântulas de macieira reduz significativamente a severidade do fogo bacteriano, sendo associada com o aumento da atividade de POX que teve seu pico às 48 HAI (Hassan & Buchenauer, 2007) ou 14 dias após o tratamento com o indutor (Brisset *et al.*, 2000). A elevação da atividade de POX favorece o espessamento do parênquima e paredes celulares dificultando o estabelecimento e multiplicação de *E. amylovora* nos espaços intercelulares (Brisset *et al.*, 2000; Hassan & Buchenauer, 2007).

O pico da GLU ocorreu às 24 HAI em plântulas com resistência inata e induzida por ulvana (Fig. 11). No entanto, alguns trabalhos em macieira têm demonstrado que o pico da GLU pode ocorrer entre intervalos não analisados no atual trabalho, por exemplo, superiores às 72 HAI (Brisset *et al.* 2000; El Ghaouth *et al.*, 2002). Por exemplo, em frutos de maçã a pulverização preventiva de *Candida saitoana* Nakase & M. Suzuki elevou significativamente a atividade de GLU, com o pico às 96 HAI com *Botrytis cinerea* Pers. ex Fries (El Ghaouth *et al.*, 2002). Enquanto, Brisset *et al.* (2000) encontrou o pico de GLU em plântulas de macieira, somente 14 dias após o tratamento com acibenzolar para o controle do fogo bacteriano. Apesar disso, não se pode descartar a hipótese que o pico da GLU possa ter ocorrido antes das 24 HAI, já que estas enzimas possuem função imediata na defesa de plantas, com ação direta sobre as hifas invasoras (Pascholati & Leite, 1995; Baysal & Zeller, 2005).

A atividade de GLU não foi alterada pela resistência inata e induzida por ulvana (Fig. 11). A baixa atividade da GLU em plântulas de macieira com resistência inata e induzida, comparada a testemunha pode ser explicada por dois fatores: o tratamento de ulvana e/ou a inoculação de *C. gloeosporioides* não elicitaram a produção de

glucanases em macieira; a ulvana não ativa o gene de transcrição da GLU.

Na resistência inata e induzida, os mecanismos de defesa são dependentes do genótipo das plantas (Steiner & Schönbeck, 1995). Assim, pode existir ou não uma relação entre o tratamento e o patógeno desafiante na ativação dos mecanismos de defesa de plantas. Borsato (2009), por exemplo, usando o mesmo polissacarídeo utilizado no presente trabalho, observou aumento significativo da atividade de GLU em plantas de feijoeiro moderadamente suscetíveis a *U. appendiculatus*, no entanto a atividade desta enzima em plantas consideradas resistentes não foi alterada.

A pulverização preventiva de ulvana em *A. thaliana* (Stadnik *et al.*, 2009c) e *M. truncatula* (Cluzet *et al.*, 2004) sinaliza a transcrição de genes que ativam enzimas relacionadas à defesa de plantas como: quitinases, porém não de GLU. Os resultados do presente estudo, também sugerem que a pulverização de ulvana não sinaliza a transcrição do gene que ativa a GLU em macieira.

Em suma, a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* não foi alterada pela resistência inata e induzida por ulvana. O desenvolvimento de estruturas de infecção em plântulas resistentes foi semelhante àquele observado nas suscetíveis. A resistência inata da macieira a MFG parece estar relacionada ao rápido reconhecimento de *C. gloeosporioides* com maior atividade de POX às 24 HAI. A redução da MFG por ulvana foi associada à menor formação de apressórios e alongamento do tubo germinativo do *C. gloeosporioides*, além do aumento da atividade de POX em plântulas às 72 HAI. A atividade de GLU não foi alterada pela resistência inata e induzida por ulvana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM, Associação brasileira de produtores de maçã (2009) Produtividade de maçã. Disponível em: www.abpm.org.br/ - Acesso em: 20 julho.

ABREU GF, TALAMINI V, STADNIK MJ (2008) Bioprospecção de macroalgas marinhas e plantas aquáticas para o controle da antracnose do feijoeiro. **Summa Phytopathology** 34:78-82.

ANDRADE EM, UESUGI CH, UENO B, FERREIRA MASV (2007) Caracterização Morfocultural e Molecular de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. **Fitopatologia Brasileira** 32:21-31.

AGRIOS GN (2005) (Ed.) **Plant Pathology**, Academic Press, San Diego 635 p.

ARAÚJO L, BORSATO LC, VALDEBENITO-SANHUEZA RM, STADNIK MJ (2008) Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology** 33:74-80.

ARAÚJO L & STADNIK MJ (2009) Uso do método de folhas destacadas para testar a resistência á mancha foliar de glomerella. In XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Rio de Janeiro, **Anais.....**844.

ARGENTA LC (2002) Fisiologia pós-colheita: maturação, colheita e armazenagem dos frutos. In: EPAGRI (Ed.) **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, pp.691-732.

ASTHIR B, PREET K, BATTA SK, SHARMA B (2009) Role of antioxidative enzymes in red rot resistance in sugarcane. **Sugar Tech** 11:282-287.

BALARDIN RS (1997) Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira** 22:50-53.

BASTMEYER M, DEISING HB, BECHINGER C (2002) Force exertion in fungal infection. **Annual Review of Biophysics & Biomolecular Structure** 31:321-341.

BAYSAL O & ZELLER W (2005) Extract of *Hedera helix* induces resistance on apple rootstock M26 similar to Acibenzolar-S-methyl against Fire Blight (*Erwinia amylovora*). **Physiological and Molecular Plant Pathology** 65:305-315.

BECKER WF, KATSURAYAMA Y, BONETI JIS (2000) Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira. **Agropecuária Catarinense** 13:14-20.

BENTES JLS & MATSUOKA K (2002) Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* E *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. **Fitopatologia Brasileira** 27:071-077.

BETTIOL W & GHINI R (2004) Métodos alternativos usados com sucesso no Brasil para o controle de doenças de plantas. In: STADNIK MJ, TALAMINI V (Eds.) **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp.143-158.

BONETI JIS & KATSURAYAMA Y (1999) Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork.). In: BONETI JIS, RIBEIRO LG, KATSURAYAMA Y (Eds.) **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, Epagri, pp.13-95.

BONETI JI DA S, KATSURAYAMA Y, BLEICHER J (2002) Doenças da macieira. In: EPAGRI (Ed.) **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, pp. 527-593.

BONETI JIS, BECKER WF, KATSURAYAMA Y (2004) Sistema de previsão da mancha-foliar-da-gala em macieira, cultivar gala. **Agropecuária Catarinense** 17:64-67.

BORSATO LC (2009) Avaliação da resistência de cultivares de feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à ferrugem e mecanismos de defesa elicitados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus*. **Dissertação de Mestrado**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 62 p.

BLEICHER J (2002) Botânica e fisiologia. In: EPAGRI (Ed.) **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, pp.29-36.

BRDE – Banco Regional do Desenvolvimento do Extremo Sul (2000) Estudos sobre o setor de maçãs na região sul do Brasil, Disponível em: www.brde.com.br- Acesso em: 20 março.

BRADFORD MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** 72:248-254.

BRISSET MN, CESBRON S, THOMSON SV, PAULIN JP (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. **European Journal of Plant Pathology** 106:529-536.

CAMARGO LEA (1995) Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN FILHO A, KIMATI H, AMORIM L (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo, Ceres, pp. 455-469.

CASTELLANI A (1939) Viability of some pathogenic fungae in distilled water. **The Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 42:225-226.

COSTA IFD, BALARDIN RS, MEDEIROS LA, BAYER TM (2006) Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos. **Ciência Rural** 36:1684-1688.

CHIOVITTI A, KRAFT GT, BACIC A, LIAO ML (2001) Gelling polysaccharides from Australian seaweeds: research and potential. **Marine and Freshwater Research** 52:917-935.

CLUZET S, TORREGROSA C, JACQUET C, LAFITE C, FOURNIER J, MERCIER L, SALAMAGNE S, BRIAND X., ESQUERRÉ-TUGAYÉ MT, DUMAS B (2004) 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** 27:917-928.

CRUSIUS LU, FORCELINI CA, SANHUEZA RMV, FERNANDES JMC (2002) Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira** 27:65-70.

DANTAS ACM, SILVA MF, NODARI RO (2009) Avanços genéticos da macieira no controle de doenças In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp.127-152.

DEISING HB, WERNER S, WERNITZ M (2000) The role of fungal appressoria in plant infection. **Review Microbes and Infection** 2:1631-1641.

DIÉGUEZ-URIBEONDO J, FÖRSTER H, SOTO-ESTRADA A, ADASKAVEG JE (2005) Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond. **Phytopathology** 95:751-758.

EL GHAOUTH A, WILSON CL, WISNIEWSKI M (2002) Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. **Phytopathology** 93:344-348.

FAIZE M., BRISSET MN, PERINO C , VIAN B, BARNY MA, PAULIN JP, THARAUD M (2006) Protection of apple against fire blight induced by an *hrpL* mutant of *Erwinia amylovora*. **Biologia Plantarum** 50:667-674.

FERNANDES WS (2007) Respostas de defesa e resistência induzida por ulvana à antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) em cultivares de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.). **Dissertação de Mestrado**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 71 p.

GARRIDO LR, SONEGO OR, VALDEBENITO-SANHUEZA RMV (2004) Controle racional de doenças da videira e da macieira. In: STADNIK MJ, TALAMINI V (Eds.) **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp.17-30.

GONZALEZ E & SUTTON TB (2004) Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing Glomerella leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. **Plant Disease** 88:1335-1340.

GONZALEZ E, SUTTON TB, CORRELL JC (2006) Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. **Phytopathology** 96:982-992.

GUERRA DS (2007) Predisposição de macieiras (*Malus domestica* Borkh) com infecções virais a *Cryptosporiopsis perennans* (Zeller & Childs) Wollenweber em frutos e *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig.) Penzig. & Sacc. em folhas. **Tese de Doutorado**. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 99 p.

GUZZO SD & MARTINS EMF (1996) Local and systemic induction of β -1,3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal Phytopathology** 144:449-454.

HAMADA NA (2005a) Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da mancha-foliar-da-gala (*Colletotrichum* spp.). **Agropecuária Catarinense** 18:73-77.

HAMADA NA (2005b) Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira. **Dissertação de Mestrado**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 106 p.

HAMMERSCHMIDT R & KUC J (1982) Lignification as mechanism for induced systemic resistance in cucumber. **Physiological Plant Pathology** 20:61-71.

HASSAN MAE & BUCHENAUER H (2007) Induction of resistance to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. **Journal of Plant Diseases and Protection** 114:151-158.

ICEPA, Instituto de Planejamento e Economia Agrícola de Santa Catarina (2007) Síntese anual de agricultura de Santa Catarina 2004-2005. Disponível em: www.icepa.com.br/ - Acesso em: 20 março.

IUCHI VL (2002) Botânica e fisiologia. In: Epagri (Ed.) **A Cultura da Macieira**. Florianópolis, Epagri, pp.59-104.

KATSURAYAMA Y & BONETI JIS (2009) Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp. 45-64.

KINKEL LL (1997) Microbial population dynamics on leaves. **Annual Review Phytopathology** 35:327-347.

KOLATTUKUDY PE, KIM YK, LI D, LIU ZM, ROGERS L (2000) Early molecular communication between *Colletotrichum gloeosporioides* and its host. In: PRUSKY D, FREEMAN S, DICKMAN MB (Eds.) **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction**. The American Phytopathological Society, pp. 78-98.

KUPPER KC, GIMENES-FERNANDES N, GOES A (2003) Controle biológico de *Colletotrichum acutatum*, agente causal da queda prematura dos frutos cítricos. **Fitopatologia Brasileira** 28:251-257.

KLARZYNSKI O, PLESSE B, JOUBERT JM, YVIN JC, KOOP M, KLOAREG B, FRITIG B (2000) Linear β -1,3 glucans are elicitors of defense responses in tobacco. **Plant Physiology** 124:1027-1037.

LANNA RF (2008) Isolamento e seleção de procariotos residentes de filoplano do tomateiro com potencial para o controle de doenças da cultura. **Dissertação de Mestrado**. Viçosa, Universidade Federal de Viçosa, 52 p.

LAHAYE M & ROBIC A (2007) Structure and functional properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. **Biomacromolecules** 8:1765-1774.

LEITE JUNIOR RP, TSUNETA M, KISHINA AY (1988) Ocorrência da mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná. **Informe de pesquisa Iapar**. Londrina PR, Informe 81:6p.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2009) Agricultura- Safra agrícola. Disponível em: www.agricultura.gov.br/ - Acesso em: 15 junho.

MAZARO SM (2007) Indução de resistência a doenças em morangueiro pelo uso de elicitores. **Tese de Doutorado**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 87 p.

MENDGEN K, HAHN M, DEISING H (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology** 34:364-386.

MENDGEN K & HAHN M (2002) Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Review Trends in Plant Science** 10:1-5.

METRAUX JP (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. **European Journal of Plant Pathology** 107:13-18.

MONDINO P (2004) Manejo ecológico de fitopatógenos em Uruguay. In: STADNIK MJ, TALAMINI V (Eds.) **Manejo ecológico de doenças de plantas**. Florianópolis, CCA-UFSC. pp.159-176.

NISHIMURA M & SOMERVILLE S (2002) Resisting attack. **Science** 295:2032-2033.

O'CONNELL RJ, PERFECT SE, HUGHES HB, CARAZANIGA R, BAILEY JA (2000) Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY D, FREEMAN S, DICKMAN MB (Eds.) **Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction**. The American Phytopathological Society, pp. 57-77.

PARISI L, LESPINASSE Y, GUILLAUMES J, KRÜGER J (1993) A New Race of *Venturia inaequalis* Virulent to Apples with Resistance due to the *Vf* Gene. **Phytopathology** 83:533-537.

PASCHOLATI SF & LEITE B (1995) Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO A, KIMATI H, AMORIM L (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. São Paulo, Ceres, pp. 417-452.

PAULERT R (2005) Atividade antimicrobiana e controle da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) utilizando polissacarídeo e extratos da macroalga marinha *Ulva fasciata*. **Dissertação de Mestrado**. Florianópolis, Universidade Federal de Santa Catarina, 90 p.

PAULERT R, TALAMINI V, CASSOLATO JEF, DUARTE MER, NOSEDA MD, SMANIA JA, STADNIK MJ (2009) 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 Diseases and Protection** 116:263-270.

PERCIVAL GC & BOYLE S (2009) Evaluation of film forming polymers to control apple scab (*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Wint.) under laboratory and field conditions. **Crop Protection** 28:30-35.

PEREIRA AL, SILVA GS, RIBEIRO VQ (2006) Caracterização fisiológica, cultural e patogênica de diferentes isolados de *Lasiodiplodia theobromae*. **Fitopatologia Brasileira** 31:572-578.

PERES NA, TIMMER LW, ADASKAVEG JE, CORRELL JC (2005) Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. **Review of Plant Disease** 89:784-796.

PETRI JL, PALLADINI LA, POLA AC (2002) Dormência e indução da brotação da macieira. In: EPAGRI (Eds) **A cultura da macieira**. Florianópolis, Epagri, pp. 261-298.

RAUSCHER M, ADAM AL, WIRTZ S, GUGGENHEIM R, MENDGEN K, DEISING HB (1999) PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. **The Plant Journal** 6:625-633.

RESENDE MLV, SALGADO SML, CHAVES ZM (2003) Espécies Ativas de Oxigênio na Resposta de Defesa de Plantas a Patógenos. **Fitopatologia Brasileira** 28:123-130.

ROLLEMBERG CL (2008) Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas. **Dissertação de mestrado**. Curitiba, Universidade Federal do Paraná, 124 p.

RYALS J, UKNES S, WARD E (1994) Systemic Acquired Resistance. **Plant Physiology** 104:1109-1112.

SCUSSEL VM & GALVÃO S (2009) Contaminação de maçãs e seus derivados por agrotóxicos e micotoxinas In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp.191-218.

STADNIK MJ & BUCHENAUER H (2000) Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology** 57:25-34.

STADNIK MJ & MAZZAFERA P (2001) Interações oídio-hospedeiro. In: STADNIK MJ & RIVERA (Eds.) **Oídios**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, pp. 79-118.

STADNIK MJ & MARASCHIN M (2004) Indução de resistência de plantas a fitopatógenos. In: STADNIK MJ, TALAMINI V (Eds.) **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp. 221-244.

STADNIK MJ & PAULERT R (2008) Uso de macroalgas marinhas na agricultura. **Memórias do Museu Nacional**. Rio de Janeiro, pp. 267-279.

STADNIK MJ, ARAÚJO L, VALDEBENITO-SANHUEZA RM (2009a) Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp.105-126.

STADNIK MJ, MONDINO P, BUTIGNOL CA (2009b) Bases conceituais da proteção do cultivo de macieira In: STADNIK MJ (Ed.) **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp.1-20.

STADNIK MJ, STEINHAUSER C, DURNER J (2009c) Gene expression and nitric oxide production of Arabidopsis suspension cells treated with ulvan. In XLII Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Rio de Janeiro, **Anais.....**874.

STEINER U & SCHÖNBECK F (1995) Induced disease resistance in monocots. In: HAMMERSCMIDT R & KUC J. **Induced resistance to disease in plants**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp.86-110.

TALAMINI V & STADNIK MJ (2004) Extratos vegetais e de algas no controle de doenças de plantas. In: STADNIK MJ, TALAMINI V (Eds.) **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis, CCA-UFSC, pp. 45-62.

TUCKER SL & TALBOT NJ (2001) Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology** 39:385-417.

VALDEBENITO-SANHUEZA RM, BECKER WF, BONETI JIS, KATSURAYAMA Y, CZERMAINSKI ABC (2002) Manejo das doenças de verão na produção integrada. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Uva e Vinho**. Bento Gonçalves RS, Boletim 36:11 p.

VALDEBENITO-SANHUEZA RM & BETTI JA (2005) Doenças da macieira. In: KIMATI H, AMORIM L, REZENDE JAM, BERGAMIN FILHO A, CAMARGO LEA (Eds.) **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo, Ceres, pp.421-433.

VAN LOON LC, REP M, PIETERSE CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. **Annual Review of Phytopathology** 44:135-162.

WHARTON PS, JULIAN AM, O'CONNELL RJ (2001) Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology** 91:149-158.

WHARTON PS, DIÉGUEZ-URIBEONDO J (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid** 61:3-22.

WIRTH SJ & WOLF GA (1996) Soluble, dye-labelled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity. **Journal of Microbiological Methods** 25:337-342.

8- ANEXOS

Anexo 1: Análise de variância fatorial ($p \leq 0,05$) do efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas superiores e inferiores de plântulas/plantas de macieira.

AACPD							
Ensaio	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV
1*	Tratamento	1	44,062	44,062	8,357	0,005	42,4
	Posição	1	42,657	42,657	8,091	0,006	
	T*P	1	15,467	15,467	2,933	0,092	
	Erro	56	295,227	5,272			
2*	Tratamento	1	186,123	186,123	28,628	0,000	38,6
	Posição	1	28,077	28,077	4,318	0,042	
	T*P	1	1,713	1,713	0,263	0,609	
	Erro	56	364,073	6,501			
3**	Tratamento	1	140,964	140,964	19,363	0,000	29,8
	Posição	1	18,467	18,467	2,536	0,011	
	T*P	1	7,244	7,244	0,995	0,322	
	Erro	56	407,681	7,280			
Área necrosada							
Ensaio	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV
1*	Tratamento	1	3,695	3,695	6,338	0,014	28,7
	Posição	1	4,487	4,487	7,697	0,007	
	T*P	1	1,402	1,402	2,406	0,126	
	Erro	56	32,647	0,583			
2*	Tratamento	1	22,941	22,941	26,924	0,000	30,3
	Posição	1	9,670	9,670	11,349	0,001	
	T*P	1	0,000	0,000	0,000	1,000	
	Erro	56	47,716	0,852			
3**	Tratamento	1	40,573	40,573	23,281	0,000	38,0
	Posição	1	11,029	11,029	6,328	0,014	
	T*P	1	2,8406	2,840	1,630	0,206	
	Erro	56	97,592	1,742			

Dados do ensaio transformados para *raiz (x)+1 e **raiz (x). FV= Fontes de variação; T*P= Tratamento*posição; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, CV= Coeficiente variação %.

Anexo 2: Resultado do teste t ($p \leq 0,05$) do efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas superiores de plântulas/plantas de macieira.

AACPD				
Ensaio	Tratamento	Média	Resultado do teste t	P
1*	Água	50,73	a	0,028
	Ulvana	22,37	b	
2*	Água	65,68	a	0,002
	Ulvana	30,5	b	
3**	Água	137,53	a	0,000
	Ulvana	65,77	b	
Área necrosada				
Ensaio	Tratamento	Média	Resultado do teste t	P
1*	Água	6,12	a	0,011
	Ulvana	3,15	b	
2*	Água	10,34	a	0,002
	Ulvana	4,37	b	
3**	Água	26,51	a	0,000
	Ulvana	9,73	b	

Na análise estatística os dados do ensaio foram transformados para raiz* $(x)+1$ e **raiz (x) . P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado.

Anexo 3: Resultado do teste t ($p \leq 0,05$) do efeito de ulvana sobre a área necrosada (%) aos dez dias após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides* e área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) em folhas inferiores de plântulas/plantas de macieira

AACPD				
Ensaio	Tratamento	Média	Resultado do teste t	P
1*	Água	17,64	n.s.	0,282
	Ulvana	13,85		
2*	Água	54,58	a	0,000
	Ulvana	13,84	b	
3**	Água	99,47	a	0,032
	Ulvana	63,08	b	
Área necrosada				
Ensaio	Tratamento	Média	Resultado do teste t	P
1*	Água	2,47	n.s.	0,406
	Ulvana	2,11		
2*	Água	5,98	a	0,000
	Ulvana	1,51	b	
3**	Água	14,96	a	0,013
	Ulvana	7,24	b	

Na análise estatística os dados do ensaio foram transformados para raiz* $(x)+1$ e **raiz (x) . Na análise estatística os dados do ensaio foram transformados raiz (x) . P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado. n.s. = não significativo.

Anexo 4: Anova de regressão de dados ($p \leq 0,05$) de germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI).

Água - Modelo quadrático							
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²	CV%
Horas	2	1575,4	787,7	2,20	0,15	100	26,0
Erro	12	4282,5	356,8				
Ulvana - Modelo quadrático							
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²	CV%
Horas	2	500,6	250,3	1,77	0,21	100	16,8
Erro	12	1696,1	141,3				
Resistente - Modelo quadrático							
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²	CV%
Horas	2	1896,5	948,2	2,36	0,13	100	35,2
Erro	12	4820,9	401,7				

FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, R²= Coeficiente de determinação; CV= Coeficiente variação.

Anexo 5: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI).

Germinação de conídios às 24 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV %
Horas	2	0,64	0,32	1,17	0,34	6,4
Erro	12	3,28	0,27			
Germinação de conídios às 48 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	4,24	2,12	2,22	0,15	15,1
Erro	12	11,45	0,95			
Germinação de conídios às 72 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	22,99	11,49	9,48	0,00	13,9
Erro	12	14,54	1,21			

*Dados transformados para raiz (x). FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio;

Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de Fc>F esperado; CV= Coeficiente variação.

Anexo 6: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* sem apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Classes com: um tubo germinativo (1TG), mais de um tubo germinativo (>1TG).

Conídios germinados sem apressório*							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	1370,1	685,05	20,75	0,00	11,2
	Erro	12	396,10	33,01			
48	Horas	2	13,19	6,60	43,15	0,00	8,4
	Erro	12	1,83	0,15			
72	Horas	2	28,16	14,08	26,01	0,00	18,3
	Erro	12	6,49	0,54			
Conídios germinados sem apressório com 1TG*							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	11,82	5,91	18,14	0,00	11,4
	Erro	12	3,91	0,32			
48	Horas	2	11,49	5,74	28,99	0,00	10,0
	Erro	12	2,37	0,19			
72	Horas	2	27,05	13,52	29,09	0,00	16,6
	Erro	12	5,58	0,46			
Conídios germinados sem apressório com >1TG**							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	0,40	0,20	1,97	0,18	15,8
	Erro	12	1,24	0,10			
48	Horas	2	2,88	1,44	4,32	0,09	32,0
	Erro	12	3,99	0,33			
72	Horas	2	2,30	1,15	2,816	0,09	35,6
	Erro	12	4,91	0,40			

Dados transformados para *raiz (x), **raiz (x) +1. FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de Fc>F esperado, CV= Coeficiente variação.

Anexo 7: Resultado do teste de separação de médias Tukey ($p \leq 0,05$) da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* sem apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Classes com: um tubo germinativo (1TG), mais de um tubo germinativo (>1TG).

Conídios germinados sem apressório*			
HAI	Tratamento	Média	Teste Tukey
24	Água	18,00	a
	Ulvana	40,00	b
	Resistente	23,00	a
48	Água	12,00	a
	Ulvana	33,00	b
	Resistente	18,00	a
72	Água	8,00	a
	Ulvana	37,00	b
	Resistente	16,00	a
Conídios germinados sem apressório com 1TG*			
24	Água	17,50	a
	Ulvana	38,50	b
	Resistente	22,00	a
48	Água	11,80	a
	Ulvana	31,00	b
	Resistente	17,00	a
72	Água	7,25	a
	Ulvana	35,00	b
	Resistente	15,20	a
Conídios germinados sem apressório com >1TG**			
24	Água	0,50	n.s.
	Ulvana	1,50	
	Resistente	1,00	
48	Água	0,20	n.s.
	Ulvana	2,00	
	Resistente	1,00	
72	Água	0,75	n.s.
	Ulvana	2,00	
	Resistente	0,80	

Na análise estatística os dados do ensaio foram transformados para * raiz (x) e **raiz (x) +1. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado. n.s. = não significativo.

Anexo 8: Análise de variância ($p \leq 0,05$) de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI).

Conídios germinados com apressório ^a							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	4,97	2,48	3,43	0,06*	10,0
	Erro	12	8,69	0,72			
48	Horas	2	3,51	1,75	3,55	0,06*	30,7
	Erro	12	5,94	0,49			
72	Horas	2	7,55	3,77	8,83	0,00	26,5
	Erro	12	5,12	0,42			

^aDados transformados para raiz (x). *ANOVA ($p \leq 0,06$). FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, CV= Coeficiente variação.

Anexo 9: Resultado do teste de separação de médias Tukey ($p \leq 0,05$) de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI).

Conídios germinados com apressório ^a			
HAI	Tratamento	Média	Teste Tukey
24	Água	82,0	a*
	Ulvana	60,0	b
	Resistente	77,0	ab
48	Água	88,0	a*
	Ulvana	67,0	b
	Resistente	82,0	ab
72	Água	92,0	a
	Ulvana	63,0	b
	Resistente	84,0	a

^aDados transformados para raiz (x). Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado *($p \leq 0,06$).

Anexo 10: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Classes com: um apressório (1AP), um apressório e um tubo germinativo (1AP+1TG), mais de um apressório ($>1AP$).

Conídios germinados com 1AP*							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	4,80	2,40	4,24	0,04	9,0
	Erro	12	6,79	0,56			
48	Horas	2	5,38	2,69	3,97	0,04	9,4
	Erro	12	8,12	0,67			
72	Horas	2	8,86	4,43	12,5	0,00	6,8
	Erro	12	4,22	0,35			
Conídios germinados com 1AP+1TG**							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	0,65	0,32	2,15	0,15	22,8
	Erro	12	1,81	0,15			
48	Horas	2	4,72	2,36	3,93	0,04	39,7
	Erro	12	7,19	0,59			
72	Horas	2	1,81	0,90	1,54	0,25	42,8
	Erro	12	7,01	0,58			
Conídios germinados com $>1AP$ **							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	0,01	0,00	0,04	0,95	28,7
	Erro	12	2,68	0,22			
48	Horas	2	0,49	0,24	1,61	0,24	30,7
	Erro	12	1,83	0,15			
72	Horas	2	0,04	0,02	0,23	0,79	26,5
	Erro	12	1,15	0,09			

Dados transformados para *raiz (x), **raiz (x) + 1. FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, CV= Coeficiente variação.

Anexo 11: Resultado do teste de separação de médias Tukey ($p \leq 0,05$) da frequência das classes de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI).

Conídios germinados com 1AP*			
HAI	Tratamento	Média	Teste Tukey
24	Água	80,10	a
	Ulvana	58,80	b
	Resistente	75,60	ab
48	Água	87,00	a
	Ulvana	62,75	b
	Resistente	80,50	ab
72	Água	91,00	a
	Ulvana	60,20	b
	Resistente	83,00	a
Conídios germinados com 1AP+1TG**			
24	Água	0,90	n.s.
	Ulvana	0,50	
	Resistente	0,90	
48	Água	1,00	a
	Ulvana	4,00	b
	Resistente	1,00	a
72	Água	0,60	n.s.
	Ulvana	2,50	
	Resistente	0,50	
Conídios germinados com >1AP**			
24	Água	1,00	n.s.
	Ulvana	0,70	
	Resistente	0,5	
48	Água	0,00	n.s.
	Ulvana	0,25	
	Resistente	0,50	
72	Água	0,40	n.s.
	Ulvana	0,30	
	Resistente	0,50	

Classes com: um apressório (1AP), um apressório e um tubo germinativo (1AP+1TG), mais de um apressório (>1AP). Na análise estatística os dados do ensaio foram transformados para * raiz (x) e

**raiz (x) +1. Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado. n.s. = não significativo.

Anexo 12: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da frequência das classes de comprimento de tubo germinativo de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com um único apressório sobre a superfície foliar de plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Classes com: tubo germinativo curto ($\leq 10 \mu\text{m}$) e longo ($> 10 \mu\text{m}$).

Tubo germinativo curto ^a							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
24	Horas	2	12,22	6,11	8,08	0,00	11,6
	Erro	12	9,06	0,75			
48	Horas	2	25,95	12,97	5,63	0,01	19,9
	Erro	12	27,65	2,30			
72	Horas	2	27,81	13,90	5,14	0,02	21,5
	Erro	12	32,47	2,70			
Tubo germinativo longo ^a							
HAI	FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV
24	Horas	2	4,13	2,06	3,33	0,06*	21,1
	Erro	12	7,45	0,62			
48	Horas	2	21,57	10,78	16,44	0,00	22,2
	Erro	12	7,87	0,65			
72	Horas	2	11,42	5,71	3,34	0,06*	35,9
	Erro	12	20,48	1,70			

^aDados transformados para raiz (x). *ANOVA ($p \leq 0,06$). FV= Fonte de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, CV= Coeficiente variação.

Anexo 13: Resultado do teste de separação de médias Tukey ($p \leq 0,05$) da frequência das classes de comprimento de tubo germinativo de conídios germinados de *Colletotrichum gloeosporioides* com um único apressório sobre a superfície foliar de plântulas de maceira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI). Classes com: tubo germinativo curto ($\leq 10 \mu\text{m}$) e longo ($> 10 \mu\text{m}$).

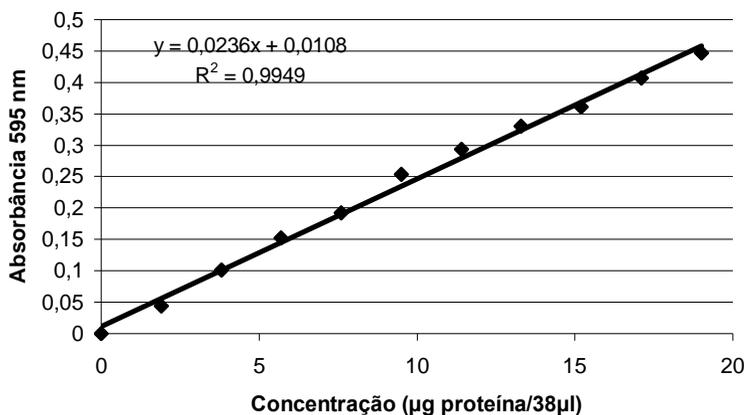
Tubo germinativo curto ^a			
HAI	Tratamento	Média	Teste Tukey
24	Água	68,00	a
	Ulvana	38,00	b
	Resistente	65,00	a
48	Água	78,30	a
	Ulvana	34,10	b
	Resistente	71,70	ab
72	Água	81,85	a
	Ulvana	34,90	b
	Resistente	72,00	ab
Tubo germinativo longo ^b			
HAI	Tratamento	Média	Teste Tukey
24	Água	12,10	a*
	Ulvana	20,80	b
	Resistente	10,60	a
48	Água	8,70	a
	Ulvana	28,65	b
	Resistente	8,30	a
72	Água	9,15	a*
	Ulvana	25,30	b
	Resistente	11,00	ab

^aDados transformados para raiz (x). Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado * ($p \leq 0,06$).

Anexo 14: Resultado do teste t ($p \leq 0,05$) da localização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre células epidérmicas e paredes anticlinais das células epidérmicas na epiderme de plântulas de macieira às 48 horas após a inoculação.

Localização apressório na epiderme	Média*	Resultado do teste t	P
Células epidérmicas	26,67	a	0,004
Paredes anticlinais das células epidérmicas	73,33	b	

*Média de conídios de *C. gloeosporioides* desenvolvidos sobre a epiderme de plântulas suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes.



Anexo 15: Curva padrão de proteína e equação da concentração de proteína utilizando BSA (Albumina de soro bovino) como proteína padrão e reagente de Bradford diluído.

Anexo 16: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da quantificação de proteínas totais em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (HAI) de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Proteínas totais às 24 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV %
Horas	2	1,04	0,52	0,50	0,62	28,4
Erro	8	8,24	1,03			
Proteínas totais às 48 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	0,88	0,44	0,77	0,48	18,4
Erro	11	6,33	0,57			
Proteínas totais às 72 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	1,60	0,80	1,19	0,35	18,0
Erro	8	5,38	0,67			

*Dados transformados para raiz (x). FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado; CV= Coeficiente variação

Anexo 17: Anova de regressão de dados ($p \leq 0,05$) da atividade de peroxidases em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Água - Modelo quadrático						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²
Horas	2	28,10	14,05	6.76	0.01	100
Erro	8	30,48	3,81			
Ulvana - Modelo quadrático						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²
Horas	2	18,84	9,42	6.80	0.01	100
Erro	8	22,27	2,78			
Resistente- Modelo Linear						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²
Horas	2	6,32	3,16	1.22	0.33	100
Erro	11	28,42	2,58			

FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, R²= Coeficiente de determinação.

Anexo 18: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da atividade de peroxidases (POX) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Atividade POX às 24 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV %
Horas	2	2,75	1,37	9,86	0,00	20,32
Erro	8	1,11	0,13			
Atividade POX às 48 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	0,20	0,10	0,58	0,57	18,77
Erro	11	1,90	0,17			
Atividade POX às 72 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	1,86	0,93	6,56	0,02	21,21
Erro	8	1,13	0,14			

*Dados transformados para raiz (x). FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado; CV= Coeficiente variação.

Anexo 19: Resultado do teste de separação de médias Tukey ($p \leq 0,05$) da atividade de peroxidases (POX) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

HAI	Tratamento	Média	Teste Tukey
24	Água	1,54	a
	Ulvana	2,44	a
	Resistente	5,84	b
48	Água	4,58	n.s.
	Ulvana	5,76	
	Resistente	4,99	
72	Água	1,21	a
	Ulvana	4,27	b
	Resistente	4,16	b

*Na análise estatística os dados do ensaio foram transformados para raiz (x). Letras diferentes indicam diferença significativa de acordo com o teste realizado. n.s. = não significativo.

Anexo 20: Anova de regressão de dados ($p \leq 0,05$) da atividade de glucanases (GLU) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Água - Modelo quadrático						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²
Horas	2	7,61	3,80	2.01	0.17	100
Erro	12	22,65	1,88			
Ulvana - Modelo quadrático						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²
Horas	2	9,44	4,72	4.32	0.03	100
Erro	12	13,10	1,09			
Resistente- Modelo quadrático						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	R ²
Horas	2	22,60	11,30	1.97	0.18	100
Erro	12	68,64	5,72			

FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado, R²= Coeficiente de determinação.

Anexo 21: Análise de variância ($p \leq 0,05$) da atividade de glucanases (GLU) em plântulas de macieira suscetíveis tratadas com água ou ulvana e resistentes às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*.

Atividade GLU às 24 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV %
Horas	2	0,35	0,17	0,79	0,47	21,85
Erro	12	2,66	0,22			
Atividade GLU às 48 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	0,18	0,09	0,63	0,54	23,20
Erro	12	1,70	0,14			
Atividade GLU às 72 HAI*						
FV	GL	SQ	QM	Fc	P	CV%
Horas	2	0,05	0,02	0,10	0,90	28,90
Erro	12	2,99	0,24			

*Dados transformados para raiz (x). FV= Fontes de variação; GL= Graus de liberdade; SQ= Soma dos quadrados; QM= Quadrado médio; Fc= Valor do F-teste calculado; P= Probabilidade de $F_c > F$ esperado; CV= Coeficiente variação.