

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CHRISTTIANNO DE LIMA ROLLEMBERG

**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.**

CURITIBA

2008

i

CHRISTTIANNO DE LIMA ROLLEMBERG

**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 apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração em Produção Vegetal, Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo, Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Agronomia.

Orientadora:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Louise Larissa May De Mio

Co-orientador:

Prof. Dr. Reginaldo da Silva Romeiro

CURITIBA

2008

**DEDICO:**

As minhas queridas avós, Emília e Amélia.

Aos meus irmãos, Christtiani e Edgard.

Aos meus pais Edgard e Vivian

E aos eternos amigos, Andressa Thür (*in memoriam*) e Christtianno Oliveira (*in memoriam*).

Por acreditarem, apoiarem, compreenderem e me incentivarem nesta nova etapa de trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me proporcionar força e perseverança nos momentos mais difíceis.

À Universidade Federal do Paraná, por meio da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, área de concentração “Produção Vegetal” pela oportunidade e espaço concedido para a realização deste curso.

À professora, Dr<sup>a</sup> Louise Larissa May De Mio, pela orientação, paciência, confiança e incentivo durante todo o período de realização dos trabalhos de pesquisa e elaboração desta dissertação.

Ao professor, Dr. Reginaldo da Silva Romeiro, pelo auxílio, co-orientação, amizade e presteza durante a realização dos experimentos.

A todos os professores do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo da UFPR, pela amizade, sabedoria e eficiência em seus ensinamentos.

Aos colegas de curso, em especial, Maria Carolina Sabbagh, Renata Bolzan, Carlise Pereira, Anne Dewulf pelo entusiasmo, coleguismo e esperança, verdadeiros parceiros durante esta caminhada.

Aos alunos de graduação e estagiários Faisal Fayad, André Fabri, Érica Shiono, Rodrigo Caetano e Diogo Tutida pela colaboração e companheirismo nos trabalhos, além de, proporcionar momentos maravilhosos e pela amizade verdadeira.

Aos funcionários do Depto. De Fitotecnia e Fitossanitarismo pela prestação de serviços e amizade, em especial Gilson, Cléia, Maria Emília, Lucimara, Gregório e José.

Aos amigos do laboratório que tanto me ensinaram, apoiaram e me fizeram rir nos momentos estressantes em dias de trabalho, Lígia, Vânia, Giselda Alves, Rodrigo, Thiago, Wellington.

Aos integrantes da Banca Examinadora da Pré-Defesa: Dr<sup>a</sup>. Lucimeris Ruaro, Dr. Celso Garcia Auer e Dr<sup>a</sup> Louise L. May De Mio pelas sugestões.

Ao CNPq pela concessão da bolsa, apoio fundamental à execução deste trabalho.

Ao Viveiro Clone, pela valiosa contribuição em doar as mudas de macieira sem as quais não teríamos conseguido concluir o trabalho.

Aos meus familiares pelo apoio e motivação em todos os momentos.

As grandes amigas, Andressa e Silvana, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos e amizade verdadeira.

A minha amiga, Natasha Hamada, por compartilhar de seus conhecimentos e de toda ajuda em esclarecer minhas dúvidas sobre os patógenos dessa pesquisa.

Ao meu amigo e companheiro de apartamento, Stefano, pelas conversas, conselhos, jantares e a amizade verdadeira.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar ao fim desta obra.

Em fim, aos Professores de banca, pela dedicação, compreensão, análise e recomendações para o aperfeiçoamento e melhorias deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XV</b>
<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>19</b>
2.1 ORIGEM DO HOSPEDEIRO E IMPORTÂNCIA DA CULTURA E DA ENFERMIDADE.....	19
2.2 PATÓGENO.....	22
2.3 EPIDEMIOLOGIA, SINTOMATOLOGIA E CONTROLE DA DOENÇA.....	24
2.4 RESIDENTES DE FILOPLANO COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	27
2.5 POSSÍVEIS MECANISMOS DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS EXERCIDOS POR RESIDENTES DE FILOPLANO.....	30
2.5.1 <i>Competição por nutrientes</i> .....	30
2.5.2 <i>Produção de antibióticos</i> .....	30
2.5.3 <i>Indução de resistência</i> .....	31
2.5.4 <i>Alterações na condição de umidade na superfície foliar</i> .....	31
2.5.5 <i>Interferência na produção de enzimas do patógeno</i> .....	31
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>32</b>
<b>4 CAPITULO I - CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE COLLETOTRICHUM SPP. EM MACIEIRA</b> .....	<b>44</b>
4.1 INTRODUÇÃO.....	46
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.2.1 <i>Coleta e isolamento</i> .....	48
4.2.2 <i>Caracterização fisiológica</i> .....	49
4.2.3 <i>Teste de patogenicidade</i> .....	51
4.3 RESULTADOS.....	53
4.3.1 <i>Isolamento</i> .....	53
4.3.2 <i>Caracterização fisiológica</i> .....	54

4.3.3	<i>Teste de patogenicidade</i> .....	60
4.4	DISCUSSÃO .....	61
4.5	CONCLUSÕES .....	67
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	67
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA VISANDO O BIOCONTROLE DA MANCHA DAS FOLHAS DA MACIEIRA</b> .....	<b>73</b>
5.1	INTRODUÇÃO .....	76
5.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	77
5.2.1	<i>Obtenção dos isolados bacterianos residentes de filoplano</i> .....	77
5.2.2	<i>Inibição de germinação de conídios de Colletotrichum spp. pelas bactérias residentes de filoplano</i> .....	78
5.2.3	<i>Inibição de crescimento micelial</i> .....	79
5.2.4	<i>Produção de compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis</i> . ....	79
5.2.5	<i>Produção de compostos antifúngicos voláteis</i> .....	80
5.2.6	<i>Bioensaio com folhas destacadas de macieira para seleção de bactérias residentes de filoplano de macieira</i> . ....	80
5.2.7	<i>Estratégia adotada para a seleção massal</i> .....	81
5.2.8	<i>Seleção final dos antagonistas</i> .....	82
5.3	RESULTADOS .....	83
5.3.1	<i>Isolamento de bactérias residentes de filoplano de macieira</i> .....	83
5.3.2	<i>Atividade de residentes de filoplano de macieira na germinação de conídios de Colletotrichum spp.</i> .....	83
5.3.3	<i>Atividade de residentes de filoplano no crescimento micelial de Colletotrichum spp.</i> .....	84
5.3.4	<i>Atividade de compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis e voláteis</i> . 86	
5.3.5	<i>Bioensaio com folhas destacadas de macieira para seleção massal de residentes de filoplano</i> . ....	88
5.3.6	<i>Seleção final dos isolados bacterianos residentes de filoplano de macieira</i> 91	
5.4	DISCUSSÃO .....	92
5.5	CONCLUSÕES .....	97
5.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

<b>6</b>	<b>CAPÍTULO III - SENSIBILIDADE DE AGENTES BACTERIANOS DE CONTROLE BIOLÓGICO A FUNGICIDAS E INSETICIDAS AGRÍCOLAS UTILIZADOS NA CULTURA DA MACIEIRA .....</b>	<b>104</b>
6.1	INTRODUÇÃO .....	106
6.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	107
6.2.1	<i>Sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas de uso agrícola</i> 107	
6.2.2	<i>Capacidade de alterar pH.....</i>	<i>108</i>
6.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	109
6.4	CONCLUSÕES .....	111
6.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>118</b>
<b>8</b>	<b>ANEXO .....</b>	<b>120</b>

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DO CRESCIMENTO (IVCM) PARA *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* (CG), *C. ACUTATUM* (CA) E *GLOMERELLA CINGULATA* (GC), AGENTES ETIOLÓGICOS DA MFM SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURITIBA, PR, 2007. 55
- FIGURA 2 - PRODUÇÃO DE CONÍDIOS ( $10^6$  CONÍDIOS.  $ML^{-1}$ ) PARA *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* (CG), *C. ACUTATUM* (CA), AGENTES ETIOLÓGICOS DA MFM SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURITIBA, PR, 2007. ....57
- FIGURA 3 - PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS ( $10^6$  CONÍDIOS.  $ML^{-1}$ ) PARA *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* (CG), *C. ACUTATUM* (CA), AGENTES ETIOLÓGICOS DA MFM SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURITIBA, PR, 2007. ....57
- FIGURA 4 - CRESCIMENTO MICELIAL MEDIDO ATRAVÉS DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL (IVCM) DE *COLLETOTRICHUM ACUTATUM* (CA), *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* (CG) E *GLOMERELLA CINGULATA* (GC) EM DIFERENTES VALORES DE PH. CURITIBA, PR, 2007. ....60
- FIGURA 5 - NÚMERO DE ISOLADOS DE PROCARIOTAS RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA COM RELAÇÃO A SUA ATIVIDADE NAS FAIXAS DE INIBIÇÃO (%) OU ESTIMULAÇÃO (%) DA GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS DE *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* (CG) E *C. ACUTATUM* (CA). CURITIBA, PR, 2007. ....84
- FIGURA 6 – DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLAMENTOS DE RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA EM RELAÇÃO A SUA ATIVIDADE CONTRA O MICÉLIO *COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIODES* (CG) E *C. ACUTATUM* (CA) E *GLOMERELLA CINGULATA* (GC). CURITIBA, PR, 2007. ....85

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ISOLADOS PATOGÊNICOS DE MANCHA DAS FOLHAS DE MACIEIRA INDICANDO A LOCALIDADE, O ÓRGÃO VEGETAL DO QUAL FOI ISOLADO E A IDENTIFICAÇÃO.....	53
TABELA 2 - ÍNDICE DE VELOCIDADE DO CRESCIMENTO MICELIAL (IVCM) PARA <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> (CG), <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC), AGENTES ETIOLÓGICOS DA MFM SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURITIBA, PR, 2007.....	54
TABELA 3 - PRODUÇÃO E PORCENTAGEM DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS PARA <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> (CG), <i>C. ACUTATUM</i> (CA), AGENTES ETIOLÓGICOS DA MFM SUBMETIDOS A DIFERENTES TEMPERATURAS. CURITIBA, PR, 2007.....	56
TABELA 4 - CRESCIMENTO MICELIAL MEDIDO COM O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL (IVCM) E A ESPORULAÇÃO ( $10^6$ CONÍDIOS.ML <sup>-1</sup> ) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> (CG), <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC) EM DIFERENTES MEIOS DE CULTURAS. CURITIBA, PR, 2007.....	58
TABELA 5 - CRESCIMENTO MICELIAL MEDIDO ATRAVÉS DO ÍNDICE DE VELOCIDADE DE CRESCIMENTO MICELIAL (IVCM) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> , <i>C. ACUTATUM</i> E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> EM DIFERENTES VALORES DE PH. CURITIBA, PR, 2007.....	59
TABELA 6 - TESTE DE PATOGENICIDADE EM FRUTOS E FOLHAS MEDIDO ATRAVÉS DO NÚMERO E ÁREA (MM <sup>2</sup> ) DE LESÕES PELA INOCULAÇÃO ( $10^4$ CONÍDIOS.ML <sup>-1</sup> ) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> , <i>C. ACUTATUM</i> . CURITIBA, PR, 2007.....	61
TABELA 8 - CRESCIMENTO MICELIAL MÉDIO (MM <sup>2</sup> ) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC) PELOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS NA PRIMEIRA ETAPA DA SELEÇÃO MASSAL INDICANDO A LOCALIDADE DE ONDE FOI COLETADO AS AMOSTRAS. CURITIBA, PR, 2007.....	86
TABELA 9 - CRESCIMENTO MICELIAL MÉDIO (MM <sup>2</sup> ) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC) PELOS ISOLADOS BACTERIANOS SELECIONADOS NA PRIMEIRA ETAPA DA SELEÇÃO MASSAL INDICANDO O ÓRGÃO VEGETAL ONDE FORAM ENCONTRADOS. CURITIBA, PR, 2007.....	86
TABELA 10 - SUPRESSÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL (% SCM) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOESPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC) POR RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA PELA AÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS TERMOESTÁVEIS (CAT) E VOLÁTEIS (CAV) PRODUZIDOS. CURITIBA, PR, 2007.....	87
TABELA 11 – NÚMERO E ÁREA TOTAL (MM <sup>2</sup> ) DAS LESÕES EM FOLHAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM <i>C. GLOESPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) TRATADAS COM BACTERIAS RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA. CURITIBA, PR, 2007.....	88

TABELA 12 – RELAÇÃO DE ISOLADOS DE ANTAGONISTAS SELECIONADOS PARA O BIOCONTROLE DA MANCHA DAS FOLHAS DE MACIEIRA A PARTIR DA COMBINAÇÃO DE RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS TERMOESTÁVEIS (CAT) E VOLÁTEIS (CAV), NÚMERO E ÁREA TOTAL DAS MANCHAS EM FOLHAS DESTACADAS. CURITIBA, PR, 2007. ....	89
TABELA 13 - SUPRESSÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC) PELA AÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS TERMOESTÁVEIS (CAT) E VOLÁTEIS (CAV) PRODUZIDOS. POR 17 RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA INDICANDO A LOCALIDADE DE PROCEDÊNCIA. CURITIBA, PR, 2007. ....	90
TABELA 14 - SUPRESSÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL (%) DE <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC) PELA AÇÃO DE COMPOSTOS ANTIFÚNGICOS TERMOESTÁVEIS (CAT) E VOLÁTEIS (CAV) PRODUZIDOS. POR 17 RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA INDICANDO O ÓRGÃO VEGETAL DE RESIDÊNCIA. CURITIBA, PR, 2007. ....	90
TABELA 15 – PERÍODO DE LATÊNCIA (EM DIAS) E INCIDÊNCIA (%) DA MANCHA DAS FOLHAS DA MACIEIRA EM MUDAS SADIAS OBTIDAS EM ENSAIOS REALIZADOS OBJETIVANDO A SELEÇÃO FINAL DE ANTAGONISTAS PELA DA PULVERIZAÇÃO DE MUDAS COM ANTAGONISTAS E POSTERIORES INOCULAÇÕES COM PROPÁGULOS DO PATÓGENO. CURITIBA, PR, 2007. ....	91
TABELA 16 – VALOR DE P COMPARADO ENTRE OS ISOLADOS E A TESTEMUNHA 01 (SEM APLICAÇÃO DE ANTAGONISTAS) E ENTRE OS ISOLADOS BATERIANOS E A TESTEMUNHA 02 (APLICAÇÃO DE FUNGICIDA) PARA INCIDÊNCIA, SEVERIDADE E LATÊNCIA. CURITIBA, PR, 2007. ....	92
TABELA 17 - SENSIBILIDADE DE 19 ANTAGONISTAS (BACTÉRIAS RESIDENTES DE FILOPLANO) A 7 FUNGICIDAS E 6 INSETICIDAS, REGISTRADOS PARA CULTURA DA MACIEIRA. CURITIBA, PR, 2007. ....	115
TABELA 18 - CRESCIMENTO DOS ANTAGONISTAS QUANDO EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS PRINCIPAIS FUNGICIDAS E INSETICIDAS AGRÍCOLAS UTILIZADOS EM MACIEIRA. CURITIBA, PR, 2007. ....	116
TABELA 19 - CAPACIDADE DE METABOLIZAÇÃO DOS ANTAGONISTAS QUANDO EXPOSTOS A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS PRINCIPAIS 7 FUNGICIDAS E 6 INSETICIDAS AGRÍCOLAS UTILIZADOS EM MACIEIRA. CURITIBA, PR, 2007. ....	117
TABELA 7 - RELAÇÃO DE ISOLADOS DE ANTAGONISTAS PRÉ-SELECIONADOS PARA O BIOCONTROLE DA MANCHA DAS FOLHAS DE MACIEIRA, A PARTIR DA PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DE GERMINAÇÃO DE CONÍDIOS E INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO MICELIAL EM RELAÇÃO A <i>COLLETOTRICHUM GLOEOSPORIOIDES</i> (CG) E <i>C. ACUTATUM</i> (CA) E <i>GLOMERELLA CINGULATA</i> (GC). CURITIBA, PR, 2007. ....	121

## LISTA DE ABREVIATURAS

AVA – Aveia Ágar;

BDA – Batata Dextrose Ágar;

BRF – Bactérias Residentes de Filoplano

CA – *Colletotrichum acutatum*;

CAT – Compostos Antifúngicos Termoestáveis;

CAV – Compostos Antifúngicos Voláteis;

CG – *Colletotrichum gloeosporioides*;

EFMA – Extrato de Folhas de Macieira Ágar;

GC – *Glomerella cingulata*;

h – hora

IVCM – Índice de Velocidade de Crescimento Micelial;

LEMID – Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças

MDA – Maçã Dextrose Ágar;

MFM – Mancha das Folhas da Macieira

min – minuto

PA. – Podridão Amarga

PMF – Período de Molhamento Foliar;

s – segundos;

SCM – Supressão de Crescimento Micelial

SMA – Suco de Maçã Ágar.

## RESUMO

A mancha das folhas da macieira, incitada pelos fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella cingulata*, é a principal doença dessa cultura no Estado do Paraná causando danos na produção. As medidas de controle recomendadas; como remoção de material infectado e uso de fungicidas, não têm sido eficientes e pouco se sabe sobre as características do patógeno nesta região. Por esses motivos, o objetivo desse trabalho foi: a) caracterizar fisiologicamente os três isolados patogênicos, bem como avaliar a patogenicidade em folhas e frutos de macieira; b) Isolar de filosfera de macieira isolados bacteriano para serem testados em relação ao antagonismo ao patógeno, c) avaliar o antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos obtidos da filosfera de macieira em relação aos patógenos quanto à inibição da germinação de conídios, do crescimento micelial, a produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis, e a inibição da formação de manchas em folhas destacadas de macieira; d) avaliar *in vivo* a capacidade dos isolados pré-selecionados em inibir a infecção de mudas de macieira pelo fungo *C. acutatum* e; e) avaliar o efeito de fungicidas e inseticidas no desenvolvimento dos antagonistas. Para caracterização fisiológica, os três patógenos, foram avaliados quanto ao crescimento micelial, produção e germinação de conídios em nove diferentes temperaturas (4, 10, 15, 20, 22, 25, 28, 32 e 35 °C), além de avaliar o crescimento micelial em cinco diferentes meios de cultivo (BDA, EFMA, MDA, SMA, AVA) e a 11 valores de pH (3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 6.8, 7.0, 7.5 e 8.0). O teste de patogenicidade foi realizado em frutos e folhas de macieira cultivar Gala. Para a seleção das bactérias, amostras de partes de filoplano de macieira sadias foram coletadas em pomares comerciais de quatro municípios da região produtora de maçãs no Estado do Paraná. As referidas amostras foram submetidas à extração de sua flora epifítica por lavagem do filoplano e semeio de diluições do lavado em meio de cultura. Dessa maneira foram obtidas 142 culturas de procariontes residentes de filoplano de macieira. A seleção massal foi realizada pela combinação dos dados obtidos de ensaios *in vitro* onde foi avaliada a potencialidade dos isolados em inibirem a germinação de conídios e o crescimento micelial,

produzirem compostos antifúngicos voláteis e termoestáveis e, na potencialidade dos isolados inibirem a infecção de folhas destacadas de macieira. Combinando os resultados dos ensaios da seleção massal, foram escolhidos 17 isolados, os quais foram submetidos à seleção final baseada na prevenção da infecção de mudas de macieira em condições de campo analisando a incidência, severidade e período de latência. Os 17 isolados escolhidos para o biocontrole da mancha das folhas foram estudados quanto à sua sensibilidade a fungicidas e inseticidas aplicados na cultura da macieira. Para este estudo foram realizados testes de sensibilidade e de alteração de pH de 13 produtos. Para o crescimento micelial, a faixa de temperatura ótima ficou entre 22-28 °C. Para a produção de conídios ficou numa faixa entre 25-28 °C e a temperatura ótima para germinação de conídios foi de 25 °C. Os meios SMA, MDA e BDA proporcionaram os maiores crescimentos miceliais, enquanto os meios EFMA e AVA, proporcionaram a maior produção de conídios. A *G. cingulata* não foi utilizada devido a não esporulou no períodos ensaios. A faixa ótima de pH para crescimento dos três isolados patogênicos da Mancha das Folhas ficou entre 6,5 – 7,5. As folhas inoculadas com os patógenos apresentaram sintomas de Mancha das Folhas enquanto que em frutos houve a formação de sintomas da Mancha das Folhas e da Podridão Amarga. Combinando os resultados da seleção massal, foram escolhidos 17 isolados considerando-se acima de 80 a 100 % de inibição de germinação e área de crescimento micelial menor que 90 mm<sup>2</sup>. No campo, pela análise não paramétrica foi observada diferença significativa entre seis isolados bacterianos e testemunha para o período de latência e incidência, porém, para severidade não houve significância. Os isolados de folhas A19, A131, A132 (Campo Largo), A68, A69 (Porto Amazonas), A135 e A137(Quatro Barras) foram os mais eficientes no controle da doença. Houve sensibilidade dos antagonistas a dois fungicidas e a três inseticidas. Houve alteração do pH de todos os fungicidas e inseticidas pelos 17 isolados antagonísticos.

**Palavras-chaves:** bactérias, controle biológico, *Malus domestica*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum* spp.

## ABSTRACT

Glomerella leaf spot of the apple tree, caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* and *Glomerella cingulata*, is the main disease of this culture in the state of Parana causing damage in production. Measures to control recommended, like the removal of infected material and the use of fungicides, have not been efficient, little is known about the characteristics of the pathogen in this region. The objective of this work was: a) to characterize the three isolated pathogenic ones physiological as to evaluate the pathogenicity in leaves and fruits of apple tree b) to evaluate isolated antagonisms in vitro of the bacterial ones in relation to the pathogene, how much to the inhibition of conidial germination of, micelial growth, production of thermostable and volatile antifungal composites and in the inhibition of formation of spots in detached leaves of apple tree; c) to evaluate in alive the capacity of the isolated ones preselected in inhibiting the infection of changes of apple tree for fungus *C. acutatum*; d) to evaluate the effect of fungicides and insecticides in the development of the antagonists. For physiological characterization, the three pathogenes of the spot of leaves, had been evaluated when micelial growth, production and conidias germination in nine different temperatures (4, 10, 15, 20, 22, 25, 28, 32 and 35 °C) beyond evaluating the micelial growth in five different ways of culture (BDA, EFMA, MDA, SMA, AVA) and the 11 values of pH (3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 6,8, 7,0, 7,5 and 8,0). The pathogenicity test was carried through in fruits and leaves of apple tree to cultivate 'Gala'. For election of the bacteria, samples of healthy parts of phylloplane of apple tree had been gotten in collections carried through in commercial plantations four cities of the producing region of the State of the Paraná. The related samples had been submitted to the extration of its epifítica flora for laudering of the phylloplane and sow of dilutions of the washed one in way of culture. In this way 142 resident cultures of procariotas of phylloplane of apple tree had been gotten. The massal election was carried through by the combination of the gotten data of assays in vitro where the potentiality of the isolated ones in inhibiting the conidial germination and micelial growth was evaluated, to produce volatile and thermostable antifungal composites e, in the potentiality of the isolated ones to inhibit the detached leaf infection

of apple tree. Combining the results of the assays of the massal election, isolated ones had been chosen 17, which had been submitted to the final election based in the prevention of the infection of changes of apple tree in conditions the field analyzing the incidence, severity and period of latency. The 17 isolated ones chosen for biocontrol of the *Glomerella* leaf spot had been studied how much to its sensitivity the fungicides and insecticides applied in the culture of the apple tree. For this study tests of sensibility and alteration of pH of 13 products had been carried through. For the micelial growth, the temperature band was between 22-28°C. For the conidial production it was in a band between 25-28 °C and the conidial germination was in the temperature of 25 °C. Half SMA, MDA and BDA had provided micelial crescimentos greater, whereas the half EFMA and AVA, had provided to greater conidial production. The band of pH for growth of the three isolated pathogenic ones of the *Glomerella* Leaf Spot was between 6,5 - 7,5. Leves inoculated with the patogenos had presented symptoms of Spot of Leves whereas in fruits had the formation of symptoms of the *Glomerella* Leaf Spot and the Bitter rot. Combining the results of the massal election, isolated ones had been chosen 17 considering above of 80 100% of inhibition of germination and area of lesser micelial growth that 90 (mm<sup>2</sup>). In the field, by the analysis distribution free significant difference between six isolated bacterial ones was observed and testifies for the period of latency and incidence, however, for significant severity did not have leaf difference being the isolated ones A19, A131, A132 (Campo Largo), A68, A69 (Porto Amazonas), A135 and A137 (Quatro Barras) most efficient in the control of the illness. It was observed that it had sensitivity the two fungicides and the three insecticides. However, it had alteration of pH of all the isolated fungicides and insecticides for the 17 antagonistic ones.

**Key words: bacteria, biological control, *Malus domestica*, *Glomerella cingulata*, *Colletotrichum* spp.**

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A maçã é uma das mais importantes frutas de clima temperado comercializada como fruta fresca, em nível mundial. A produção de maçã está concentrada na Região Sul do Brasil, que é responsável por 98 % da produção nacional. Sua produtividade evoluiu nos últimos anos, passando de 20 a 25 t/ha nos anos 90, para aproximadamente 40 a 60 t/ha em 2000 (ABPM 2005). A matriz produtiva brasileira apresenta a seguinte distribuição varietal: Gala (46 %), Fuji (45 %), Golden Delicious (6 %) e outras (3 %). O principal estado produtor é Santa Catarina, seguido do Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo. No Paraná, cuja área plantada é de 2.196 ha, o principal pólo produtor localiza-se na região de Palmas, ao Sul do Estado (NACHTIGALL, 2004).

Atualmente, os maiores entraves à produção de maçã estão relacionados ao manejo fitossanitário, pois há determinadas doenças e pragas que agravam os custos de produção. Somando-se a isso, a crescente exigência da sociedade internacional de preservação e uso adequado dos recursos naturais e de qualidade dos alimentos, impõem um realinhamento do sistema produtivo de maçãs. Neste contexto, a implantação de um sistema de Produção Integrada da Maçã, viável economicamente, está adequando e habilitando a cadeia produtiva da maçã brasileira a competir em igualdade de condições com os países concorrentes tanto no mercado interno quanto no externo (NACHTIGALL, 2004).

A sarna da macieira é a doença mais importante da cultura, destacando-se, também, outras doenças da parte aérea da macieira. Conhecidas com doenças de verão porque seus sintomas são visíveis, em maior intensidade, nesse período do ano. Entre elas, encontram-se: a mancha das folhas (*Glomerella cingulata* / *Colletotrichum* spp.), a podridão amarga (*Glomerella cingulata* / *Colletotrichum* spp.), a podridão branca (*Botryosphaeria dothidea*, sin. *B. berengeriana*) e a podridão-olho-de-boi (*Pezizula malicorticis*). O impacto potencial destas doenças no Sul do Brasil foi constatado no ciclo de 1997-1998, quando se verificaram perdas de 10 % a 20 % em pomares de cultivar. Fuji, com alta infecção de mancha das folhas, podridão amarga e podridão branca (HAMADA, 2006). Já na cultivar. Gala, 90 % dos pomares foram afetados pela mancha foliar (NACHTIGALL, 2004).

A Mancha das Folhas da Macieira (MFM), também conhecida como Mancha Foliar de *Glomerella*, ou Mancha Foliar da Gala, pode causar desfolhamento superior a 75 ou n% e conseqüentemente afetar a produção nos anos seguintes. Essa doença vem se disseminando e aumentando sua incidência a cada ciclo produtivo, por todas as regiões produtoras de maçã no Brasil (BONETI et al., 1998).

São relatadas três espécies do fungo *Colletotrichum* associadas à Mancha das Folhas, sendo elas *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, sendo as duas primeiras mais agressivas (KATSURAYAMA et al., 2000). Tradicionalmente, as espécies de *Colletotrichum* têm sido identificadas através da caracterização morfológica, tais como a morfologia conidial, presença ou ausência de setas, presença ou não da forma perfeita *Glomerella cingulata* e da cor da colônia (GUNNEL e GUBLER, 1992). Entretanto, quando se trata de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum*, a utilização de parâmetros fisiológicos nem sempre são estudados, devido à grande diversidade existente dentro de cada espécie (MILLS et al., 1992).

No Paraná, a mancha das folhas em macieira, tem grande importância, devido a maioria dos pomares serem implantados com a cultivar Gala, muito susceptível a doença, e, também, ao clima que favorece o desenvolvimento e a disseminação do patógeno. Além disso há um difícil manejo da doença no estado do Paraná, já que a produção integrada preconiza reduzir o número de pulverizações utilizando produtos menos tóxico, intercalando princípios ativos diferenciados (NTEPI MAÇÃ, 2007). Devido a isso, é que o controle biológico torna-se uma opção disponível para controle de doenças de plantas em associação a produção Integrada.

Dentre os diversos agentes bióticos que podem ser utilizados em controle biológico, as bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas às rizobactérias (LINDOW e LEVEAU, 2002) e esta diferença se deve, em grande parte, às características do habitat de cada um. Com isso, microrganismos com comprovada eficiência antagônica devem ter sua população aumentada na superfície da planta visando o biocontrole da doença alvo e a obtenção de antagonistas com maior capacidade de sobrevivência u visando avaliar sua efetividade em condições de campo. As bactérias do filoplano utilizam basicamente dois tipos de estratégias para sobreviverem em ambientes de estresse: de tolerância e de

escape. A primeira requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta, baixa umidade, enquanto a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais (ANDREWS e HIRANO, 1991; BEATTIE e LINDOW, 1995; BEATTIE e LINDOW, 1999; WILSON et al., 1999).

Neste contexto, a caracterização fisiológica de diferenciação entre espécies fitopatogênicas de *Colletotrichum* e a seleção de antagonistas visando o controle da mancha das folhas da macieira são importantes para a implementação de estratégias de controle, as quais podem ser úteis em programas de melhoramento visando à caracterização da resistência ao fungo *Colletotrichum* spp. Com este trabalho, objetivou-se: a) a caracterização fisiológica de isolados de *Colletotrichum* spp.; b) avaliação da patogenicidade dos fungos em folhas e frutos de macieira; c) a avaliação de antagonismo *in vitro* dos isolados bacterianos em relação aos patógenos quanto à inibição de germinação de conídios, crescimento micelial, produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis, inibição de formação de manchas em folhas destacadas de macieira como avaliar a capacidade *in vivo* dos isolados pré-selecionados em inibir a infecção de mudas de macieira pelo fungo *C. acutatum*; d) a avaliação do efeito de fungicidas e inseticidas no desenvolvimento dos antagonistas.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 ORIGEM DO HOSPEDEIRO E IMPORTÂNCIA DA CULTURA E DA ENFERMIDADE**

A macieira pertence à família Rosaceae, ordem Rosales e subfamília Pomoideae. A origem exata da espécie *Malus domestica* Borkh é desconhecida, embora haja indícios de que seja derivada da espécie *M. pumila* Mill., que ocorre naturalmente no leste europeu e oeste asiático ou da espécie *M. sieversii* (Ledeb.) M. Roem, encontrada nas montanhas da Ásia Central. Há milhares de anos, as migrações dos povos contribuíram para a disseminação da cultura a partir dos centros de origem, para diversas regiões do mundo (NACHTIGALL, 2004).

Atualmente, uma das principais frutas comercializadas no Brasil é a maçã (*Malus domestica* Borkh) e os estados da Região Sul são os seus principais produtores. O Estado de Santa Catarina, o principal produtor, responde com 52% da área plantada, e por 52% da produção nacional. O Estado do Rio Grande do Sul responde por 42% da área plantada e por 44% da produção, enquanto que o Estado do Paraná possui 6% da área plantada no país e responde por 4% da produção (BONETI et al., 2002a).

No Brasil, o cultivo da macieira é recente e se estabeleceu através de grandes empresas, atraídas por incentivos de políticas públicas. Durante os 30 anos de cultivo comercial, a produção nacional da fruta, que em 1973 era de 1.528 toneladas, cresceu para 898.961 toneladas no ano de 2004. A área plantada aumentou, entre os anos de 1987 e 2002, de 22.073 ha para 31.070 ha. Existem atualmente 2.253 produtores nacionais, estando a maioria destes concentrados no Estado de Santa Catarina (1.523 produtores) gerando 46.093 empregos diretos (ABPM, 2005). No Brasil, o consumo de maçãs em 1985 era de 2,22 kg/habitante/ano, ou 297.265 toneladas, sendo que 30% desse volume era proveniente de importações de outros países. O maior consumo per capita da fruta no país ocorreu no ano 2000, com 5,58 kg/habitante/ano, isto devido à superprodução obtida neste ano, que foi de 968.063 toneladas, pois com preços mais baixos o produto tornou-se mais acessível à população. No ano de 2002 o consumo per capita foi de 4,80 kg/habitante/ano, ou 844.900 toneladas no total, sendo que as importações representaram apenas 6% do consumo interno total. No ano de 2003, o Brasil exportou aproximadamente 76.183 toneladas da fruta (HAMADA, 2006).

As principais variedades comercializadas são a Gala e a Fuji, cujo sabor agrada os consumidores brasileiros, europeus e americanos. A cultivar Gala responde por 55% da área plantada no Estado de Santa Catarina sendo responsável por 95% da exportação. As vendas desta fruta para o mercado internacional iniciam em fevereiro e se prolongam até junho ou julho.

Segundo a Secretaria de Comércio Exterior, do Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio do Brasil, atingiram no ano de 2005, atingiu-se a produção de 100.000 toneladas, representando um montante financeiro da ordem de 40 milhões de dólares (NEY OLIVO ARALDI, citado por HAMADA, 2006).

As cultivares Gala e Fuji e seus respectivos clones (ex: Royal Gala, Fuji Suprema), apresentam as características agronômicas desejáveis para as exigências de mercado, tais como coloração, tamanho, exigência em frio. A cultivar Gala corresponde a mais da metade da área plantada atualmente no país (46%), apresentando um alto grau de adaptabilidade em nossas condições edafoclimáticas (BONETI et al., 2002a). É a cultivar mais precoce dentre as plantadas no Sul do Brasil e, por isso, geralmente alcança bom preço no mercado, exercendo importante papel na economia do setor.

Várias são as dificuldades encontradas no cultivo desta espécie, entre estas se destaca a falta de adaptação das plantas em algumas regiões, com relação a fatores edafoclimáticos relacionados à temperatura, altitude, precipitação (PETRI, 2002). Além disto, os produtores se defrontam, desde a implantação da cultura, com a incidência de diversas doenças, sendo que entre estas, as principais são a Sarna, causada pelo fungo *Venturia inaequalis* e a Mancha da Gala, causada por *Colletotrichum* spp.

A Mancha das Folhas da Macieira (MFM), também conhecida como Mancha Foliar de *Glomerella*, ou Mancha Foliar da Gala, pode causar desfolhamento superior a 75 % e conseqüentemente afetar a produção nos anos seguintes. A incidência dessa doença vem aumentando a cada ciclo produtivo, por todas as regiões produtoras de maçã do Brasil (BONETI e KATSURAYAMA, 1998). Dentre as cultivares, a Gala é altamente suscetível à Mancha da Gala, sério problema fitossanitário no sul do Brasil (CAMILO et al., 2002). São relatadas três espécies do fungo *Colletotrichum* associadas à Mancha das Folhas da Macieira, *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, sendo as duas primeiras mais agressivas (KATSURAYAMA et al., 2000).

Em anos de clima favorável à doença, a MFM tem causado elevadas perdas de produção, que em algumas áreas excederam a 20 % da safra. Prejuízos na ordem de 20 % apesar do elevado número de tratamentos com fungicidas protetores, aumentam o custo de produção em 10 % e os danos também se refletem na safra seguinte, com a perda antecipada das folhas que diminui a capacidade da fotossintética das plantas, prejudicando a próxima safra em quantidade e qualidade das frutas (GONZÁLEZ e SUTTON, 2005).

Por isso, a obtenção de clones de Gala resistentes à MFM é fundamental para a manutenção e viabilidade de cultivo desta cultivar no país e para a competitividade do setor no mercado internacional, uma vez que o Brasil exportou no ano de 2003 aproximadamente 76.183 toneladas da fruta, o equivalente a US\$ 37.720.447,00, sendo a cultivar Gala uma das principais variedades exportadas (ABPM, 2005).

A pomicultura gera 1,43 empregos diretos por hectare plantado, o que gera atualmente 45.760 postos de trabalho. O faturamento geral do setor é de R\$ 1,08 bilhões de reais. Toda esta economia corre riscos com o avanço progressivo da doença, que pode inviabilizar o cultivo da Gala em regiões de clima mais quente, pois esta é a única cultivar que produz frutas de qualidade internacional em regiões de inverno ameno (HAMADA, 2006).

## 2.2 PATÓGENO

*Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk é um fungo pertencente ao Filo Ascomycota, Classe Ascomycetes, Subclasse Sordariomycetidae, Família Glomerellaceae (New Zealand Fungi, 1913). A fase anamorfa é *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.. Além desse, também foi constatado *C. acutatum* J.H. Simmonds, associado à doença (GONZÁLEZ e SUTTON, 2005). Para outros autores como BONETI et al.(2002b), foram constatadas a existência de três espécies de fungos, *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Colletotrichum* sp. Apesar das três espécies serem patogênicas às folhas e frutos, observou-se que *C. gloeosporioides* e *Colletotrichum* sp. foram as mais severas.

A origem do patógeno não é conhecida. É possível que haja algum hospedeiro nativo e a disseminação tenha ocorrido através da grande movimentação de mudas entre as regiões produtoras.

O gênero *Colletotrichum* compreende várias espécies, incluindo saprófitas e fitopatogênicas, sendo estas responsáveis por muitas doenças economicamente importantes e que ocorrem numa ampla gama de hospedeiros (MENEZES, 2002).

O gênero apresenta acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, com espinhos ou setas, conidióforo simples e alongado, conídios hialinos unicelulares que

podem ser ovalados ou oblongos. Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz provavelmente protege os conídios da dissecação e aumenta a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro (MENEZES, 2002). Segundo MISHRA e SIRADHANA (1979) os conídios não constituem estruturas de sobrevivência porque sua viabilidade diminui rapidamente. Entretanto, o micélio pode permanecer viável por longo período em sementes infectadas, em restos de cultura, ou ainda como infecções latentes.

A forma e o tamanho dos conídios de *Colletotrichum* podem variar muito entre as espécies. No *Colletotrichum gloeosporioides* há formação de peritécios e conídios hialinos, uninucleados, retos com ápices obtusos e bases às vezes truncadas com tamanho variando entre 4,7 - 5,5 x 13,4 – 18,0 µm. em uma massa de coloração róseo salmão (SUTTON, 1992). Já *Colletotrichum acutatum* produz uma massa de conídios de coloração salmão, conídios de formato fusiforme, com uma ou ambas as extremidades afuniladas, e tamanho variando entre 4,3 – 4,8 x 11,4 – 13,9 µm e não há formação de peritécios (HAMADA, 2006).

Esse gênero revela ampla adaptação a diferentes meios de cultivo. Colônias de *C. gloeosporioides* são variáveis, de coloração branco-gelo a cinza escuro e micélios aéreos geralmente uniformes, aveludados ou repletos de conidiomatos (LOPEZ, 2001). Já *C. acutatum* é considerado tipo cromogênico, ou seja, com colônias de coloração rosada e às vezes de coloração oliva (HAMADA, 2006). SHI et al. (1996), em trabalho realizado em frutos de macieira, descrevem que tipos cromogênicos estão associados exclusivamente com *C. acutatum*.

A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa (100%). No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro por meio de uma mucilagem hemicelulósica, emitindo hifas de penetração e colonização do tecido. Além das propriedades de sobrevivência, adesão e infecção do hospedeiro, os apressórios podem germinar dando origem a outros apressórios em cadeia (MENEZES, 2002). O apressório jovem é hialino ou ligeiramente pigmentado, mas as paredes tornam-se mais espessas e escuras com o acúmulo de melanina ocorrido na sua maturação (JEFFRIES et al., 1990; BAILEY et al., 1992;

SKIPP et al., 1995). A melanização do apressório é considerada um pré-requisito da patogênese (LOPEZ, 2001). Isto pode ser explicado pelo fato de a melanina fornecer rigidez estrutural para dirigir pressão hidrostática através do poro de penetração (BAILEY et al., 1992; PRUSKY et al., 2000).

Seus hospedeiros são atacados através de vários mecanismos, podendo ocorrer a penetração do tecido cuticularizado através de apressórios ou não. Também pode ocorrer penetração direta por hifas não diferenciadas através de células não cuticularizadas, estômatos e ferimentos (VAN DER BRUGGEN e MARAITE, 1987; ZAKARIA, 1995; LOPEZ, 1999).

A interação do patógeno com sua planta hospedeira é caracterizada por uma curta fase biotrófica, quando os dois organismos ficam em contato direto na superfície celular, seguido de uma fase necrofítica destrutiva. Sintomas são visíveis neste último estágio, nas partes aéreas de plantas suscetíveis. Posteriormente, rapidamente expande-se em áreas necróticas que se desenvolvem em brotos apicais de plântulas jovens, em caules, em folhas de plantas adultas e nos frutos (BAILEY e ROWELL, 1980; ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al., 1992).

Dependendo das condições ambientes ou do grau de maturidade do hospedeiro, a penetração não ocorre imediatamente e os apressórios entram num período de quiescência. Esta propriedade é de importância considerável para espécies de *Colletotrichum* que causam infecções latentes em frutas (LOPEZ, 2001). O conceito morfológico de *Colletotrichum* é difícil de definir e as espécies são delimitadas usando poucos caracteres, como tamanho e forma dos conídios e tipos de apressórios (CANNON et al., 2000).

### **2.3 EPIDEMIOLOGIA, SINTOMATOLOGIA E CONTROLE DA DOENÇA.**

Desde a sua primeira constatação, em 1983, no município de Porto Amazonas (PR), a Mancha das Folhas da Macieira vem se espalhando por todos os pomares de maçã do Sul do Brasil (LEITE et al. 1988). A doença ficou restrita ao estado do Paraná durante aproximadamente seis anos, disseminando-se mais tarde pelos pomares de Fraiburgo, SC e Vacaria, RS (ciclo 1989/90). Em São Joaquim, SC, a MFM se estabeleceu em 1993, na comunidade de Luizinho ( $\pm$  1000 m de altitude). No entanto, a

doença só se manifestou na região mais alta de São Joaquim (1300 a 1400 m) no ciclo 1997/ 1998, após longo período de chuvas abundantes e temperaturas altas, provocadas pelo fenômeno climático El Niño (KATSURAYAMA et al., 1999b)

A MFM é favorecida pela elevação da temperatura, sendo que quando ultrapassa os 20 °C, e 10 h de período de molhamento foliar (PMF) ocorre a infecção e os sintomas apareçam em apenas 45 h, em alguns casos. Em relação aos frutos, quando submetidos a este mesmo PMF, o período de incubação do patógeno varia de 3 a 4 dias, que a doença também é favorecida pela elevação da temperatura. Entretanto, a doença também pode se estabelecer sob baixas temperaturas, como a 12 °C, desde que o PMF seja bastante longo, superior a 72 h (HAMADA, 2005). Portanto, esta manifesta-se durante o verão, causando desfolhamento severo das macieiras, provocando lesões avermelhadas nas folhas e pequenas pontuações deprimidas nos frutos (BONETTI et al., 2002b).

A origem da disseminação da doença não é conhecida. KATSURAYAMA (2001a) sugere que esta doença tenha chegado às macieiras cultivadas em São Paulo e no Paraná, a partir das culturas tropicais ou subtropicais, por exemplo, *Citrus*. De acordo com FREEMAN et al. (1999), algumas espécies de *Colletotrichum* podem estabelecer relações parasíticas com vários hospedeiros.

A doença se manifesta durante o verão, causando desfolhamento severo das macieiras dos cultivares, Gala, Senshu e Golden Delicious (KATSURAYAMA et al., 1999a).

Nas folhas, inicialmente, as lesões apresentam manchas avermelhadas, sem margens definidas, distribuídas ao acaso no limbo foliar, e de 1 a 4 mm de diâmetro. As lesões evoluem até tornarem-se amarelo-acinzentadas, às vezes com margens marrom-avermelhadas. No centro das lesões desenvolvem-se pontos escuros que são os corpos de frutificações do fungo, sendo possível visualizar sob microscópio os acérvulos com conídios e setas pretas.

Nos frutos e pedúnculos, as manchas são superficiais surgem numerosas pontuações deprimidas, de aproximadamente 1 a 3 mm de diâmetro e de cor marrom-clara e marrom-escura. Estas lesões não evoluem para a podridão amarga dos frutos

(BONETI et al., 2002b; NACHTIGALL, 2004; VALDEBENITO-SANHUEZA e BETTI, 2005).

A doença se manifesta no início do verão, quando há elevação da temperatura. Alguns estudos indicam que, em condições de campo, temperatura média diária maior ou igual a 18 °C favorece a doença. Entretanto, é em temperaturas acima de 24 °C que a doença se manifesta com maior severidade. Observa-se que outros fatores, tais como a adubação nitrogenada e sombreamentos excessivos da planta, podem favorecer a doença (BONETI et al., 2002).

O controle da MFM tem sido efetuado com a aplicação dos fungicidas mancozeb e dithianon. Apesar de satisfatório, em anos de verão quente e chuvoso, requer até 20 aplicações destes fungicidas, aliado a doses altas, as quais são efetuadas a partir de novembro e se prolongam até após a colheita, resultando em maior risco de contaminação da fruta. Por outro lado, as normas de Produção Integrada de maçã no Brasil, limitam o uso de fungicidas em até cinco aplicações anuais, podendo em casos excepcionais, atingir oito aplicações, com período de carência de 21 dias. Considerando-se que o período que antecede a colheita é o mais crítico em relação à doença, pode-se afirmar que os tratamentos utilizados atualmente não são eficazes devido às restrições quanto ao período de carência dos fungicidas. (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

KIMATI et al. (1997) e NACHTIGALL (2004), relataram que pulverizações com fungicidas convencionais têm resolvido parcialmente o problema. Atualmente os fungicidas mancozebe, captana, clorotalonil, e ditianona são os mais utilizados, sempre quando a chuva acumulada no intervalo atingir 30 mm. Outros produtos como folpet, fluazinam e ziram reduzem a epidemia, entretanto, não são muito eficientes quando a pressão da doença é muito alta. Esses produtos devem ser utilizados na dose recomendada, em intervalos máximos de 10 dias. Devem proporcionar cobertura uniforme e total das frutas e folhas Pouco se conhece sobre a etiologia e sobrevivência do *Colletotrichum*. Além disso, não se conhecem fungicidas com ação curativa. Contudo, devem-se evitar as condições que favorecem a manutenção da umidade na planta. Além de manter a área próxima da planta livre de plantas daninhas. Também,

deve-se evitar o plantio muito adensado, onde o ambiente permanece úmido por mais tempo e favorece a doença.

Após a colheita, plantas infectadas devem continuar sendo tratadas até o fim de março para reduzir o inóculo no pomar. Com isso, evitam-se prejuízos no desenvolvimento e qualidade das gemas frutíferas das macieiras no próximo ciclo vegetativo. Isto pode ser feito com os fungicidas mancozeb, enxofre e oxicloreto de cobre, utilizando-os alternadamente durante este período (KIMATI et al., 1997).

Diante disto, a obtenção de cultivares resistentes à Mancha das Folhas da Macieira é imprescindível para o controle da doença no Sul do Brasil. As práticas de controle mais importantes estão relacionadas com o manejo das plantas (poda e condução) e a profilaxia, visando reduzir as fontes de inóculo para que, na primavera seguinte, haja a menor quantidade da doença. É importante ressaltar ainda que as obtenções de clones de Gala resistentes a MFM reduziram o número de aplicações de fungicidas na cultura; o que vem ao encontro da crescente preocupação, por parte da sociedade, com a menor quantidade possível de agrotóxicos (BONETI et al., 2001).

Outra solução, para o controle de *Colletotrichum* é o uso de sais de cálcio. BIGGS (1999) testou o uso desses sais de cálcio na germinação dos conídios e na formação de lesões de podridão amarga em frutos de macieira. Concluiu que frutas tratadas com os sais do cálcio e inoculadas com os conídios de *C. gloeosporioides* ou de *C. acutatum* exibiram incidências mais baixas quando comparadas com as frutas controle. Estes experimentos demonstraram que os sais do cálcio têm a atividade supressiva aos patógenos que causam a podridão amarga e que poderiam ser usados como a parte de um programa de controle da doença.

## **2.4 RESIDENTES DE FILOPLANO COMO AGENTES DE BIOCONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS**

O termo filosfera foi adotado por LAST (1955) em analogia à rizosfera, para descrever o ambiente à superfície das folhas. Mais tarde KERLING (1958) usou o termo filosfera para descrever a zona próxima das folhas. Posteriormente LAST e DEIGHTON (1965), consideraram o termo filoplano como sendo o mais adequado para designar a

verdadeira superfície foliar. A população microbiana deste habitat apresenta enorme diversidade nos eventos e nas condições que ditam sua dinâmica tornando-as, desta maneira, complexas (KINKEL et al., 1996; KINKLE, 1997). BAKER e COOK (1974). BLAKEMAN e FOKKEMA (1982) consideram que, sendo o filoplano um habitat natural para microrganismos, muitos deles apresentam, ou podem apresentar, potencialidade como agentes de controle biológico de enfermidades. Vários são os relatos de casos de controle biológico ocorrendo naturalmente na superfície de plantas. A exemplo, podem ser citados-se SUDO (1989); JUNQUEIRA e GASPAROTO (1991); BORA et al. (1993); MICHEREF et al. (1994a); JINDAL e THIND (1994); VÉLEZ e ROSILLO (1995); PABITRA et al. (1996). Assim como SUDO (1989), BETTIOL (1997), consideraram que microrganismos com comprovada eficiência antagonica devem ter sua população aumentada na superfície da planta visando o biocontrole da doença alvo. Sendo assim, vários autores isolaram e selecionaram microrganismos residentes de filoplano visando o biocontrole de fitopatógenos.

Na obtenção de antagonistas, alguns autores obtiveram isolamentos da parte aérea de plantas e testaram-os para o biocontrole de enfermidades também na parte aérea da própria espécie vegetal de onde foram isolados, como fizeram JIMÉNEZ et al. (1988); SANDOVAL et al.(1988); MICHEREF et al. (1994b); KORSTEN et al. (1995); MIZUBUTI et al. (1995); PABITRA et al. (1996); LEITE et al. (1998); CARRER FILHO et al. (1999); HALFELD-VIEIRA et al.(2000); ROMEIRO et al. (2000a); MACAGNAN, (2005). Já outros autores, isolaram antagonistas de órgãos subterrâneos e testaram-os como antagonistas a patógenos na parte aérea de plantas conforme relatos de THOMSON et al. (1976); LIAO (1989); MICHEREF et al. (1994a); MONTESINOS et al. (1996); PERONDI et al. (1996); STROMBERG et al. (2000); YUEN et al. (2001).

Nesse sentido, O'BRIEN e LINDOW (1989), alertam que a espécie hospedeira e a condições do ambiente, como temperatura e umidade, influenciam a sobrevivência de bactérias no filoplano. Estes mesmos autores verificaram que bactérias originárias do solo sobrevivem e crescem na superfície de folhas, mas a sua população decresce mais rapidamente em virtude da flutuação das condições do ambiente quando comparadas àquelas originalmente residentes de filoplano. Em contraposição, YUEN et al. (2001) selecionaram um isolado bacteriano de uma gramínea (*Poa pratensis* L.),

como promissor para o biocontrole da ferrugem do feijoeiro. As chances de obtenção de microrganismos com potencial antagônico são aumentadas fazendo-se isolamentos do ambiente onde serão usados tornando-os adaptados a sobreviver e crescer nesse local como mencionou os autores BETTIOL (1997) e BLAKEMAN e FOKKEMA (1992). Segundo estes mesmos autores, assim como ANDREWS (1992), para um organismo ser bem sucedido no controle biológico deve ter, a capacidade de se multiplicar e colonizar o filoplano da planta.

Os critérios de seleção são pontos cruciais na prospecção de agentes de biocontrole, determinando as chances de sucesso do programa de controle biológico (BETTIOL, 1997). ANDREWS (1992), assim como BETTIOL (1997) chamaram a atenção para o fato de que, em muitos casos a seleção de antagonistas é baseada unicamente em ensaios *in vitro* considerando o seu baixo custo e rapidez. No entanto, estes mesmos autores alertaram que há baixa correlação dos resultados obtidos em condições de laboratório com os observados nas condições a campos onde são utilizados.

Por outro lado, a seleção baseada unicamente em ensaios de campo, embora possa resultar em dados mais consistentes, normalmente demandam de muito espaço. Alia-se a isso, o fato de que trabalhos consistentes de seleção de organismos normalmente iniciam-se com centenas de isolamentos (MACAGNAN, 2005).

Em trabalhos recentes sempre são mencionadas cautelosas notas a respeito de metodologias de seleção de organismos e a sua inconsistente atividade em condições de campo (MERRIMAN e RUSSEL, 1990; DEACON, 1991; BECKER e SCHWINN, 1993; COOK, 1993).

Mesmo assim, não é possível descartar o uso de testes em laboratório como ferramenta para determinar o possível modo de ação do antagonista como fizeram KRAUS e LOPER (1992); LEMANCEAU et al. (1993); GOMES et al. (1999); BARRETTI et al. (2000), ou como ferramenta para a seleção inicial (CRAWFORD et al., 1993; ELABYAD et al., 1993).

Uma maneira mais cautelosa na seleção de potenciais antagonistas, a qual será tomada como base neste trabalho, é o uso de testes de laboratório combinados com testes *in vivo* conforme trabalhos de CARRER FILHO et al. (1999); NASCIMENTO et al.

(1999); ROMEIRO et al. (2000a); ROMEIRO et al. (2000b); SILVA et al. (2000); MACAGNAN (2005). Esses autores realizaram a seleção de antagonistas em duas fases. A primeira combinou-se testes de antibiose, em laboratório, e supressão do desenvolvimento de sintomas em mudas em casa de vegetação, com um pequeno número de repetições. Nesta fase, selecionou-se, a partir de centenas de isolamentos, apenas 10 a 20 mais promissores. Estes foram novamente submetidos a testes, desta vez unicamente em *in vivo* com um grande número de repetições. E com esses resultados foram indicados apenas os mais promissores normalmente em número de dois a quatro.

## **2.5 POSSÍVEIS MECANISMOS DE CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS EXERCIDOS POR RESIDENTES DE FILOPLANO**

### **2.5.1 Competição por nutrientes**

A competição por nutrientes está envolvida em situações nas quais o antagonista consome nutrientes tornando-os indisponíveis aos patógenos que deles necessitam para desencadear o processo de patogênese (EDWARDS e BLAKEMAN, 1984). KÖHL e FOKKEMA (1998) consideraram a competição por nutrientes um importante mecanismo de biocontrole a ser explorado no controle de patógenos que apresentam uma fase saprofítica antes de sua penetração no hospedeiro e que patógenos biotróficos não são afetados por esse mecanismo de biocontrole como verificou BLUM et al. (2004).

### **2.5.2 Produção de antibióticos**

A produção de antibióticos como metabólitos secundários é comum para muitos microorganismos (BÉLANGER et al., 1995). Sob o ponto de vista destes autores, o efeito desses compostos mostra muita similaridade com o uso de fungicidas e que a sua produção e permanência na superfície da folha pode proporcionar um eficiente controle de patógenos. Agentes de biocontrole produtores de antibióticos são vistos

como produtores de compostos químicos para o controle de doenças *in situ* (UPPER, 1992).

### **2.5.3 Indução de resistência**

A resposta de resistência exibida por plantas em função de microorganismos, aplicados em seu filoplano foi estudada em detalhes por SCHÖNBECK e DEHNE (1986). Filtrados de culturas, contendo metabólitos produzidos por bactérias, induziram respostas de resistência em folhas de trigo contra míldio pulverulento (*Erysiphe graminis*) e repetidas aplicações em campos de cultivo diminuíram as perdas em decorrência da doença conforme relatos de DEHNE et al. (1984).

### **2.5.4 Alterações na condição de umidade na superfície foliar**

Em ensaios com couve chinesa onde as folhas foram tratadas com uma suspensão de *Bacillus brevis*, a umidade na superfície da folha, depois de irrigadas, foi quatro vezes menor em relação a plantas não tratadas com o organismo (SEDDON & EDWARDS, 1993; SEDDON *et al.*, 1997). EDWARDS & SEDDON (1992) consideraram que a diminuição na disponibilidade de água na superfície da planta é responsável pela redução da infecção por *Botrytis cinerea* na ordem de 65–71%.

### **2.5.5 Interferência na produção de enzimas do patógeno**

Durante o processo de infecção enzimas cutinolíticas, pectinolíticas e celulolíticas são produzidas pelo patógeno visando a sua penetração através da cutícula em direção aos tecidos internos do hospedeiro (KÖHL e FOKKEMA, 1998). Em experimentos com *Colletotrichum graminicola* a frequência de infecção em folhas de milho foi reduzida em 50% na presença de leveduras (WILLIAMSON e FOKKEMA, 1985). Segundo estes mesmos autores, não foram observados redução na germinação de esporos, crescimento superficial, ou formação de apressório pelo patógeno antes de sua penetração. Isso leva a acreditar que a interação levedura–patógeno de alguma

forma evitou a formação de enzimas envolvidas na penetração do patógeno através da parede dos tecidos do hospedeiro.

## 2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPM. **Associação Nacional dos Produtores de Maçã**. Disponível em: <<http://www.abpm.org.br/>>. Acesso em 15 set. 2005.

ANDREWS, J. H. **Biological control in the phyllosphere**. Annual Review of Phytopathology, 30: 603 - 635, 1992.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. England: CAB International Wallingford, 88-120, 1992.

BAILEY, J.A.; ROWELL, P.M. **Viability of *Colletotrichum lindemuthianum* in hypersensitive cells of *Phaseolus vulgaris***. Physiological Plant Pathology, 17: 341-345, 1980.

BAKER, K. F. & COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**, W. H. Freeman, San Francisco. 1974, 433 p.

BARRETTI, P. B., ROMEIRO, R. S., ANDRADE, C. G. & SILVA, H. S. A. **Evidência experimental de que alguns endofitas podem atuar como agentes de biocontrole em tomateiro por indução de resistência**. Fitopatologia Brasileira, 25: 319 - 320, 2000.

BECKER, J. O. & SCHWINN. **Control of soil-borne pathogens with living bacteria and fungi: status and outlook**. Pestic. Science, 37: 355 - 363, 1993.

BÉLANGER, R. R., DUFOUR, N., CARON, J. & BENHAMOU, N. **Chronological events associated with the antagonistic properties of *Trichoderma harzianum* against *Botrytis cinerea*: indirect evidence for sequential role of antibiosis and parasitism**. Biocontrol Science and Technology, 5: 41, 1995.

- BETTIOL, W. **Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 5: 59 – 97, 1997.
- BIGGS, A.R. **Effects of Calcium Salts on Apple Bitter Rot Caused by Two *Colletotrichum* spp.** Plant Dis. 83:1001-1005, 1999.
- BLAKEMAN, J. P. & FOKKEMA, N. J. **Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane**. Annual Review of Phytopathology, 20: 167-192, 1982.
- BLUM, L. E. B., AMARANTE, C. V. T., VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M., GUIMARÃES, L. S., DEZANET, A. & HACK NETO, P. ***Cryptococcus laurentii* aplicado em pós-colheita reduz podridões em maçãs**. Fitopatologia Brasileira, 29(4): 433 - 436, 2004.
- BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira** São Paulo: BASF, 1998.
- BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. **Doenças Fúngicas Foliares**. In: EPAGRI. A Cultura da Macieira. Florianópolis, 2002b. 743p.
- BONETI, J.I.S.; CESAR, J.D.; PETRI, J.L.; BLEICHER, J. **Evolução da cultura da macieira** In: A Cultura da Macieira. Florianópolis, 743p, 2002 a.
- BONETI, J.I.S.; PEREIRA, A.J.; BRIGHENTI, E.; KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S. **Situação atual e perspectiva de obtenção de cultivares e porta-enxertos de macieira resistentes às doenças, para a região subtropical**. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura
- BORA, L. C., GANGOPADHYAY, S. & CHAND, J. N. **Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists**. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 23: 162-168, 1993.
- CAMILO, A.P.; DENARDI, F. **Cultivares: Descrição e comportamento no sul do Brasil**. In: A Cultura da Macieira. Florianópolis, 2002. 743p.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. **Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics**. In.: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. American Phytopathological Society, St Paul, MN. 2000.

CARRER FILHO, R., ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., ARAUJO, J. C. A. & MIZUBUTI, E. S. G. **Residentes de filoplano e sua potencialidade no biocontrole de enfermidades da parte aérea do tomateiro**. *Fitopatologia Brasileira*, 24: 247, 1999.

COOK, R. J. **Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens**. *Annual Review of Plant Pathology*, 31: 53 - 80, 1993.

CRAWFORD, D. L., LYNCH, J. M., WHIPPS, J. M. & OUSLEY, M. A. **Isolation and characterization of actinomycete antagonists of a fungal root pathogen**. *Applied Environment Microbiology*, 59: 3899 - 3905, 1993.

DEACON, J. W. **Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-born plant pathogens**. *Biocontrol Science and Technology*, 1: 5 - 20, 1991.

DEHNE, H. W., STENZEL, K. & SCHÖNBECK, F. **Zur wirksamkeit induzierter resistenz unter praktischen anbaubedingungen**. III. Reduktion echter mehltaupilze auf induziert resistente pflanzen. *Z. PflKrank. PfSchutz*, 91: 258, 1984.

EDWARDS, M. C. & BLAKEMAN, J. P. **An autoradiographic method for determining nutrient competition between leaf epiphytes and plant pathogens**. *Journal Microscopy*, 133: 205, 1984.

EDWARDS, S. G. & SEDDON, E. ***Bacillus brevis* as a biocontrol agent against *Botrytis cinerea* on protected Chinese cabbage**. In: VERHOEFF, K., MALATHRAKIS, N. E. & WILLIAMSON, B. (Eds). *Recent advances in Botrytis research*. Wageningen: Pudoc Scientific Publishers, 1992. 267p.

ELABYAD, M. S., ELSAYED, M. A., ELSHANSHOURY, A. R. & ELSABBAGH, S. M. **Towards the biological control of fungal and bacterial diseases of tomato using antagonistic *Streptomyces* spp.** *Plant soil*, 149: 185 - 195, 1993.

ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T., et al. **Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species**. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. England, CAB international Wallingford, 121-133, 1992.

FREEMANN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. **Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits**. *Plant disease*; 82: 596-604, 1999.

GOMES, A. M. A., ARAÚJO, D. V. & MARIANO, R. L. R. **Utilização de bactérias no controle da murcha-de-fusario em tomateiro**. *Fitopatologia Brasileira*, 24: 288, 1999.

GONZÁLEZ, E. & SUTTON, T. B. **Differentiation of Isolates of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum* spp. Associated with Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apples using Growth rate, Response to temperature, and Benomyl sensitivity**. *Plant Health Progress*, 29(4): 433 - 436, 2005.

GOTO, M. **Fundamentals of Bacterial Plant Pathology**. San Diego: Academic Press, 1992. 342 p.

HALFELD-VIEIRA, B. A., ROMEIRO, R. S. & CARRER FILHO, R. **Atividade antagonística *in vitro* de residentes do filoplano de tomateiro contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos da cultura**. *Fitopatologia Brasileira*, 25: 347, 2000.

HALFELD-VIEIRA, B. A., ROMEIRO, R. S., OLIVEIRA, A. L. R., DEUNER, C. C. & MIZUBUTI, E. S. G. **Um isolado de *Pseudomonas putida* como agente de biocontrole de doenças do tomateiro em condições de campo**. *Fitopatologia Brasileira*, 26: 363, 2001.

HAMADA, N. A. **Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira**. 106p. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

HAMADA, N.A. **Influência da temperatura e do período de molhamento foliar (PMF) na incidência e severidade da Mancha Foliar da Gala (*Colletotrichum* spp.).** Agropecuária Catarinense 18(2): 73-77. 2005.

HETHERINGTON, S. D., CHAKRABORTY, S., THOMAS, M. & IRWIN, J. A. G. **The relationship between anthracnose severity and populations of bacteria on the phylloplane of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra*.** Biological Control, 5: 39 - 46, 1995.

JANISIEWICZ, W.J. & ROITMAN, J. **Biological control of *Pseudomonas cepacia*.** Phytopathology 78:194-198. 1998.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER & PLUMBIEY, R.A. **The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops.** Plant Pathology, 39: 343-366, 1990.

JIMÉNEZ, J. M., GALINDO, J. J., RAMÍREZ, C. & ENRÍQUEZ, G. A. **Evaluacion del combate biologico y quimico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao em Costa Rica.** Cocoa producers' Alliance, 553 - 456, 1988.

JINDAL, K. K. & THIND, B. S. **Evaluation of green gram microflora for the control of *Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae*, the incitant of bacterial leaf spot.** Plant Disease Research, 9: 10-19, 1994.

JUNQUEIRA, N. T. V. & GASPAROTO, L. **Controle biológico de fungos estromáticos causadores de doenças foliares em seringueira.** In: Bettiol, W. (Ed). Controle biológico de doenças de plantas. Jaguariúna: EMBRAPA - CNPDA, 1991. p 307 – 329.

KATSURAYAMA, Y. & BONETI, J.I. da S. **Aspectos epidemiológicos da mancha foliar da macieira cv. Gala.** In.: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, 2, 1999, Fraiburgo, SC. Anais...Epagri, Florianópolis, SC.. 157p. 1999 a.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & BECKER, W.F.; OZAWA, T. & TSUCHIYA, S. **Epidemiologia das Doenças da Macieira no Subtrópico e Perspectivas de**

**Manejo Integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.).** In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental, 1., 2001. Florianópolis, SC. Anais... Florianópolis, Epagri, 2001. 161p.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & OZAWA, T. **Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala.** Fitopatologia brasileira, 25 (suplemento):383 (Resumos), 2000.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. **Epidemiologia da Mancha Foliar da Gala** in IV Reunião Anual de Fitossanidade na Cultura da Macieira. São Joaquim: Epagri. 1999b.

KERLING, L. C. P. **De microflora op blad van *Beta vulgaris*.** Tijdschr Plantenziekten, 64: 402 - 410, 1958.

KINKEL, L. L., WILSON, M. & LINDOW, S. E. **Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field.** Applied and Environmental Microbiology, 62: 3413-3423, 1996.

KINKLE, L. L. **Microbial population dynamics in leaves.** Annual Review of Phytopathology, 35: 327-347, 1997.

KÖHL, J. & FOKKEMA, N. J. **Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens.** In: BOLAND, G. J. & KUYKENDALL, L. D. (Eds). Plant-Microbe Interactions and Biological control. New York Basel Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1998. p 49 – 88.

KORSTEN, L., DE JAGER, E. S., DE VILLIERS, E. E., KOTZÉ, J. M. & WEHNER, F. C. **Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases.** Plant disease, 79: 1149 - 1156, 1995.

- KRAUS, J. & LOPER, J. E. **Lack of evidence for a role of antifungal metabolite production by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 in biological control of *Pythium* damping-off of cucumber.** *Phytopathology*, 82: 264 - 271, 1992.
- LAST, F. T. & DEIGHTON, F. C. **The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves.** *Transactions of the British Mycological Society*, 48: 83 - 99, 1965.
- LAST, F. T. **Seazonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves.** *Transactions of the British Mycological Society*, 48: 221 - 229, 1955.
- LEITE Jr., R.P.; TSUNETA, M.; KISHINO, A.Y. **Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná.** Londrina, IAPAR, 1988, 6p. (IAPAR, Informe de Pesquisa, 81).
- LEITE, R. S. V., ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., KARASAWA, M., MAFFIA, L. A. & ARAUJO, J. C. A. **Controle biológico de enfermidades da parte aérea de tomateiro pelo uso de residentes de filoplano pré-selecionados como antagonistas.** *Fitopatologia Brasileira*, 23: 210, 1998.
- LEMANCEAU, P., BAKKER, P. A. H. M., DEKOGEL, W. J., ALABOUVETTE, C. & SCHIPPERS, B. **Antagonistic effect of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.** *Applied Environmental Microbiology*, 59: 74 - 82, 1993.
- LIAO, C. H. **Antagonism of *Pseudomonas putida* strain PP22 to Phytopathogenic bacteria and its potential use as a biocontrol agent.** *Plant disease*, 73: 223 - 226, 1989.
- LOPEZ, A. M. Q. **Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*** in *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo.
- MACAGNAN, D. **Isolamento e Seleção de bactérias endosporogênicas e do tipo actinomicetos visando biocontrole da vassoura-de-bruxa (*Crinipellis pernicioso*) e da podridão parda (*Phytophthora* spp.) do Cacaueiro (*Theobroma cacao* L.) e**

**estudos dos mecanismos de antagonismo ao fungo *Crinipellis perniciosa*.** 122p. Dissertação (em Fitopatologia) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2005.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. **Brock biology of microorganisms.** New Jersey: Prentice Hall, 9 ed., 2000. 1044 p.

MAURHOFER, M., KEEL, C., SCHNIDER, U., VOISARD, C., HAAS, D. & DEFAGO, G. **Influence of enhanced antibiotic production in *Pseudomonas fluorescens* strain CHA0 on its disease suppressive capacity.** *Phytopathology*, 82: 190 - 195, 1992.

MELO, I.S. **Agentes Microbianos de Controle de Fungos Fitopatogênicos.** In: MELO, I.S.; SANHUEZA, R.M. (Ed) Métodos de Seleção de Microrganismos Antagônicos a Fitopatógenos. Jaguariúna: Embrapa - CNPMA, 1995, p.17-67.

MENEZES, M. **Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*.** *Fitopatologia brasileira*, 27 (suplemento): S23, 2002.

MERRIMAN, P. & RUSSEL, K. **Screening strategies for biological control.** In: HORNBY, D. (Ed). *Biological control of soil-borne plant pathogens.* Wallingford, Oxon: C.A.B. International, 1990. 490p.

MICHEREF, S. J., SILVEIRA, N. S. S. & MARIANO, R. L. R. **Antagonismo de bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da antracnose do sorgo.** *Fitopatologia Brasileira*, 19: 541 - 545, 1994a.

MICHEREF, S. J., SILVEIRA, N. S. S., REIS, A. & MARIANO, R. L. R. **Epiphytic Bacteria Antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam.** *Microbial ecology*, 28: 101-110, 1994b

MILLS, P.R.; SREENIVASAPRAAD, S.; BROWN, A.E. **Detection and differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides*.** *FEMS Microb. Lett.* 98:137-144, 1992.

MISHRA, A.; SIRADHANA, B.S. **Studies on the survival of sorghum anthracnose (*Colletotrichum graminicola*) pathogen.** *Phillippine Agriculture* 62: 149-152. 1979.

MIZUBUTI, E. S. G., MAFFIA, L. A., MUCHOVEJ, J. J., ROMEIRO, R. S. & BATISTA, U. G. **Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust.** Fitopatologia Brasileira, 20: 540 - 544, 1995.

MONTESINOS, E., BONATERRA, A., OPHIR, Y. & BEER, S. V. **Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions.** Phytopathology, 86: 856 - 863, 1996.

NACHTIGALL, G.R. **Aspectos Socioeconômicos da Cultura da Maçã.** In: NACHTIGALL, G.R (Ed) Maçã Produção. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004 p.9-16.

NASCIMENTO, J. F., ROMEIRO, R. S., SPONHOLZ, C., RUANO, O. & PIZZINATO, M. A. **Microbiolização de sementes de algodoeiro com rizobactérias, promoção de crescimento e indução de resistência a *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum*.** Fitopatologia Brasileira, 24: 252, 1999.

NTEPI MAÇÃ – **Normas técnicas específicas para a produção integrada de maçã.** Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/credenciamento/organismos/pif.asp#maca>>. Acesso em 15 set. 2007.

O'BRIEN, R. D. & LINDOW, S. E. **Effect of plant species and enviromental conditions on epiphytic population sizes of *Pseudomonas syringae* and other bacteria.** Phytopathology,79: 619 - 627, 1989.

PABITRA, K., BORA, L. C., BHAGABATI, K. N. & KALITA, P. **Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker.** Indian Phytopathology, 49: 234-237, 1996.

PERONDI, N. L., LUZ, W. C. D. & THOMAS, R. **Controle microbiológico da giberela do trigo.** Fitopatologia Brasileira, 212: 243 - 249, 1996.

PETRI, J.L. **Fatores edafoclimáticos.** In: A Cultura da Macieira. Florianópolis, 2002. 743p.

- PRUSKY,D.; FREEMAN,S.; DICKMAN, M.B. **Colletotrichum – Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction**. St Paul, Minnesota: 99-113. APS, 2000.
- PURDY, L. H. & SCHMIDT, R. A. **Status of cocoa witches' broom: biology, epidemiology, and management**. Annual Review of Phytopathology, 34: 573-594, 1996.
- ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., CARVALHO, M. G. & CARRER FILHO, R. **Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. Summa Phytopathologica, 26: 220 - 224, 2000a
- ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., HALFELD-VIEIRA, B. A., MIZUBUTI, E. S. G. & DEUNER, C. C. **Inadequação de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico - um caso**. Summa Phytopathologica, 26: 142, 2000b
- RUDGARD, S. A. **Detailed description of symptoms of witches' broom disease of cocoa caused by *Crinipellis perniciosa*** . Cocoa Growers Bulletin, 41: 32pp., 1989.
- SANDOVAL, G. A. D., ARMBRECHT, H. & GRANADA, A. **Posibilidad de control biológico de la moniliasis del cacao**. Proceedings 10th International Cocoa Research Conference Cocoa producers' Alliance, 473 - 477, 1988.
- SANHUEZA, R.M.V. Doenças da Cultura da Maçã. In: NACHTIGALL, G.R (Ed) **Maçã Produção**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004 p.116-134.
- SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. (Eds.) **Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria**. 3 ed, St. Paul: APS Press, 2001. 373 p.
- SCHÖNBECK, F. & DEHNE, H. W. **Use of microbial metabolites inducing resistance against plant pathogens**. In: FOKKEMA, N. J. & VAN DEN HEUVEL, J. (Eds). Microbiology of the Phyllosphere. Cambridge: Cambridge University Press, 1986. 363p.

SEDDON, B. & EDWARDS, S. G. **Analysis of and strategies for the bicontrol of *Botrytis cinerea* by *Bacillus brevis* on protected Chinese cabbage.** In: FOKKEMA, N. J., KÖHL, J. & ELAD, Y. (Eds). Biological Control of foliar and postharvest diseases. IOBC/WPRS Bulletin 16 (11): 38, 1993.

SEDDON, B., EDWARDS, S. G., MARKELLOU, E. & MALATHRAKIS, N. E. **Bacterial antagonist-fungal pathogen interactions on the plant aerial surface.** In: Multitrophic interactions in terrestrial systems. GANGE, A. C. & BROWN, V. K. (eds) Blackwell Scientific Publishers 1997.

SHI, Y.; CORRELL, J.C.; GUERBER, J.C. and ROM, C.R. **Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States.** Plant Disease 80: 692-696. 1996.

SILVA, H. S. A., ROMEIRO, R. S. & DEUNER, C. C. **Rizobactérias como indutoras de resistência sistêmica à mancha pequena do tomateiro (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*).** Fitopatologia Brasileira, 25: 330 - 331, 2000.

SKIPP, R.A.; BEEVER, R.E.; SHARROCK, K.R.; RIKKERINK, E.H.A. & TEMPLETON, M.D. ***Colletotrichum*.** In: Pathogenesis and host specificity in plant diseases. Pergamon/Elsevier Sci. Ltd. Public.: Oxford, vol.II: 119-142, 1995.

STROMBERG, K. D., KINKEL, L. L. & LEONARD, K. J. **Interactions between *Xanthomonas translucens* pv. *translucens* the causal agent of bacterial leaf streak of wheat, and bacterial epiphytes in the wheat phyllosphere.** Biological Control, 17: 61 - 72, 2000.

SUDO, S. **Biocontrole de *Catacauma torrendiella* e *Coccostroma palmicola*.** USP/EMBRAPA, 57 - 59, 1989.

SUTTON, B.C. **The genus *Glomerella* and its anamorph.** In: ***Colletotrichum: Biology, pathology and control.*** England, CAB international Wallingford, 1-26, 1992.

THOMSON, S. V., SCHROTH, M. N., MOLLER, W. J. & REIL, W. O. **Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pear flowers by *Erwinia amylovora***. *Phytopathology*, 66: 1457 - 1459, 1976.

UPPER, C. D. **Manipulation of microbial communities in the phyllosphere**. In: ANDREWS, J. H. & HIRANO, S. S. (Eds). *Microbial Ecology of leaves*. New York: Springer, 1992. 451p.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y; CZERMAINSKI, A.B.C. **Manejo das Doenças de Verão na Produção Integrada de Maçã**. Circular técnica EMBRAPA n°36. Bento Gonçalves: EMBRAPA, 2002.

VAN DER BRUGGEN, P. & MARAITE, H. **Histopathology of cassava anthracnose disease caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. *manihotis***. *Parasitica*: 43: 3-21, 1987.

VÉLEZ, P. E. & ROSILLO, A. G. **Evaluación del antagonismo del hongo *Verticillium lecanii*, sobre *Hemileia vastatrix*, em condiciones de invernadero y de campo**. *Cenicafé*, 46: 45 - 55, 1995.

VIDAVER, A. K., MATHYS, M. L., THOMAS, M. E. & SCHUSTER, M. L. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola*. **Canadian Journal of Microbiology**, 18: 705-713, 1972

WILLIAMSON, M. A. & FOKKEMA, N. J. **Phyllosphere yeasts antagonize penetration from appressoria and subsequent infection of maize leaves by *Colletotrichum graminicola***. *Netherlands Journal Plant Pathology*, 91: 265, 1985.

YUEN, G. Y., STEADMAN, J. R., LINDGREN, D. T., SCHAFF, D. & JOCHUM, C. **Bean rust biological control using bacterial agents**. *Crop Protection*, 20: 395 - 402, 2001.

ZAKARIA, M. ***Colletotrichum* diseases of forest tree nurseries in Malaysia**. Bristol, UK: University of Bristol, 1995. IACR-LARS. PhD. Thesis.

### 3 CAPITULO I - CARACTERIZAÇÃO FISIOLÓGICA E PATOGENICIDADE DE COLLETOTRICHUM SPP. EM MACIEIRA

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as variações fisiológicas e patogênicas de *C. gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA) e de *Glomerella cingulata* (GC), agentes etiológicos da Mancha das Folhas da Macieira (MFM), isolados de plantas de macieira de quatro municípios da região produtora do Estado do Paraná. Foram avaliados o efeito da temperatura no índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM), produção e germinação de conídios em nove temperaturas e em cinco diferentes meios de cultura, além de avaliar o efeito do pH no crescimento micelial e a patogenicidade em folhas e frutos. Para o crescimento micelial, as temperaturas ótimas para CG, CA e GC foram de 28 °C, 25 °C e 22 °C respectivamente. Na produção de conídios, 28 °C foi a temperatura que obteve a maior produção de conídios para CG ( $19,75 \times 10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>) e 25 °C para CA ( $14,0 \times 10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>). Quanto à porcentagem de germinação, 25 °C apresentou a maior taxa de germinação tanto para CG quanto para CA. Os meios foram divididos em dois tipos: meios de cultivos sintéticos (SMA, MDA, BDA), que proporcionaram maiores crescimentos miceliais, e os meios naturais (EFMA, AVA), que proporcionaram maiores produção de conídios. A faixa ótima de pH para crescimento dos três isolados patogênicos da Mancha das Folhas ficou entre 6,5 – 7,5. As folhas inoculadas com CG e CA apresentaram sintomas de Mancha das Folhas, enquanto que nas inoculações em frutos de macieira nas cultivar Gala, foi possível verificar sintomas da Mancha das Folhas além da Podridão Amarga causada por CG e CA, respectivamente.

**Palavras – chaves:** pH, Mancha das Folhas da Macieira, *Malus domestica*, temperatura, *Glomerella cingulata*

## PHYSIOLOGICAL CHARACTERIZATION AND PATHOGENICITY OF COLLETOTRICHUM SPP. IN APPLE TREE

### ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the cultural and pathogenic variabilities of *C. gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA) and *Glomerella cingulata* (GC) isolated from plants of apple tree of four municipalities in the producing region of the state of Paraná. It was assessed the effect of temperature on the rate of speed of growth micelial (IVCM), production and germination of conidial on nine temperature and by five different methods of cultivation, in addition to evaluate the effect of pH on the growth micelial and pathogenicity in leaves and fruit. For growth micelial, the best temperature for CG, CA and GC were 28 °C, 25 °C and 22 °C respectively. For production of conidial, 28 °C was the best temperature for CG ( $19,75 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>) and 25 °C for CA ( $14,0 \times 10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>). As for the percentage of germination, 25 °C presented the best germination rate for both CG and for CA. Means of synthetic crops, AJA, ADA and PDA, which have provided more growth micelial, while the means of cultivation natural, EFMA and AVA, provided high production of conidial. The pH range for growth of three pathogenic isolates of the *Glomerella* leaf spot was between 6.5-7.5. Leaves inoculated with CG and CA showed symptoms of the *Glomerella* leaf spot while injections in the fruits of apple cultivar Gala it was possible to verify the symptoms of *Glomerella* leaf spot of Bitter rot caused by CG and CA respectively.

**Keywords:** pH, *Glomerella* leaf spot, *Malus domestica*, temperature, *Glomerella cingulata*

### 3.1 INTRODUÇÃO

A cultura da macieira (*Malus domestica* Borkh.) tem sofrido importantes perdas econômicas, devido à mancha das folhas da macieira que ocasiona desfolhamento severo, chegando a 75 % e conseqüentemente afetando a produção nos anos seguintes (BONETI e KATSURAYAMA, 1998). A doença é causada por três diferentes espécies de fungos do gênero *Colletotrichum*. São relatadas as espécies *Colletotrichum* sp., *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (*Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk) e *C. acutatum* J.H. Simmonds, sendo as duas primeiras mais agressivas conforme relato de pesquisadores no Estado de Santa Catarina (KATSURAYAMA et al. 2000). Estas espécies diferenciam-se entre si por critérios morfológicos, fisiológicos e genéticos (SUTTON, 1992, CANNON et al., 2000, GONZÁLEZ e SUTTON, 2005, HAMADA, 2006). A diferenciação das espécies de *Colletotrichum* segue características morfológicas, entretanto, usando poucos caracteres, como tamanho e forma dos conídios e tipos de apressórios (CANNON et al., 2000).

A espécie *C. gloeosporioides*, cuja forma perfeita é *G. cingulata*, produz peritécios e conídios hialinos, uninucleados, retos com ápices obtusos e bases, às vezes truncadas, com tamanho variando entre 4,7 - 5,5 x 13,4 – 18,0 µm, em uma massa de coloração róseo salmão (SUTTON, 1992). As colônias são variáveis, de coloração branco-gelo a cinza escuro e micélios aéreos geralmente uniformes, aveludados ou repletos de conidiomatos (LOPEZ, 2001).

A espécie *C. acutatum* produz uma massa de conídios de coloração salmão, conídios de formato fusiforme, com uma ou ambas as extremidades afuniladas, e tamanho variando entre 4,3 – 4,8 x 11,4 – 13,9 µm e não há formação de peritécios (HAMADA, 2006). As colônias são consideradas tipo cromogênicas, ou seja, com colônias de coloração rosada e as vezes de coloração oliva (HAMADA, 2006). SHI et al. (1996), em trabalho realizado em frutos de macieira, descrevem que tipos cromogênicos estão associados exclusivamente com *C. acutatum*.

A mancha das folhas da macieira pode formar lesões nas folhas, inicialmente, manchas avermelhadas, sem margens definidas, distribuídas ao acaso no limbo foliar, e de 1 a 4 mm de diâmetro. As lesões evoluem até tornarem – se amarelo-acinzentadas,

às vezes com margens marrom-avermelhadas. No centro das lesões desenvolvem-se pontos escuros que são os corpos de frutificações do fungo e é possível visualizar sob microscópio os acérvulos com conídios e setas pretas. Nos frutos e pedúnculos, as manchas são superficiais e surgem numerosas pontuações deprimidas, de aproximadamente 1 a 3 mm de diâmetro e de cor marrom-clara e marrom-escura. Estas lesões não evoluem para a podridão amarga dos frutos (BONETI et al., 2002; VALDEBENITO-SANHUEZA, e BETTI, 2005). Os sintomas da mancha das folhas dependem das condições ambientes, da virulência da raça e da resistência da cultivar de macieira (GONZÁLEZ e SUTTON, 2005).

GONZÁLEZ e SUTTON (2005) realizaram um estudo que envolveu caracterizações morfológicas, genéticas e moleculares sobre isolados de *G. cingulata*, *C. acutatum*, e *C. gloeosporioides*, obtidas de maçãs coletadas em diversos locais nos Estados Unidos e no Brasil, observando uma grande diversidade dentro de cada espécie. Os mesmos autores comentam que a utilização de caracteres morfológicos e fisiológicos, bem como testes de patogenicidade, são métodos rápidos e relativamente fáceis, podendo ser desenvolvidos sem a necessidade de equipamentos sofisticados, levando a diagnósticos e medidas de controle mais rápidas.

A identificação das espécies de *Colletotrichum* patogênicas de uma determinado hospedeiro, bem como a determinação de sua variabilidade, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle, além de propiciar um melhor entendimento da epidemiologia da doença. No Brasil, existem poucos estudos referentes à caracterização de espécies *Colletotrichum* associadas à macieira e estes, em geral, envolvem um número reduzido de isolados (HAMADA, 2006).

Diante disso, o objetivo deste estudo foi determinar as variações fisiológicas e patogênicas de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e de *G. cingulata* isolados de macieiras de quatro municípios da região produtora do Estado do Paraná. Foram avaliados o crescimento micelial, a produção e a germinação de conídios em nove diferentes temperaturas, além de avaliar o crescimento micelial em cinco diferentes meios de cultivo e em 11 valores de pH. O teste de patogenicidade foi realizado em frutos e folhas de macieira cultivar Gala.

## **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.2.1 Coleta e isolamento**

Folhas de macieira da cultivar 'Gala', com sintomas de Mancha das Folhas de Macieira (MFM) foram coletadas em quatro pomares, localizados em quatro diferentes municípios do estado do Paraná: Campo Largo, Lapa, Porto Amazonas (pomares convencionais) e a Quatro Barras (pomares livre de agroquímicos).

A coleta das folhas foi realizada ao acaso em toda a extensão do pomar, sendo coletadas 50 folhas em cada pomar amostrado. Além das folhas com sintomas de MFM típica, ainda foram coletados frutos, sendo estes coletados somente nos pomares dos municípios de: Campo Largo, Lapa e Quatro Barras.

As folhas e frutos foram acondicionados em sacos de papel etiquetados. Após as coletas, as amostras foram levadas ao Laboratório de Epidemiologia e Manejo Integrado de Doenças (LEMID) do Departamento de Fitotecnia e Fitossanitarismo no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná onde se realizaram os isolamentos e os ensaios.

Pequenos fragmentos de tecido infectado foram desinfestados com álcool 70 % por 30 s, hipoclorito de sódio a 0,5% por 3 min, e em seguida passaram por tríplice lavagem em água destilada esterilizada com posterior plaqueamento em meio água-ágar (17 g.L<sup>-1</sup>). Todas as placas foram mantidas em câmara B.O.D. com temperatura de 25 ± 1 °C até o aparecimento das primeiras hifas, sendo repicadas, posteriormente, para placas de Petri contendo 15 mL de BDA. Após sete dias as colônias foram enviadas a Clínica Fitopatológica da Universidade Federal de Viçosa/MG para identificação das espécies.

## 3.2.2 Caracterização fisiológica

### 3.2.2.1 Crescimento micelial, produção e germinação de conídios em diferentes temperaturas

Após a identificação das espécies de *Colletotrichum*, foram escolhidos um representante de *C. gloeosporioides* (UFPRMFM01), um de *C. acutatum* (UFPRMFM09) e um de *G. cingulata* (UFPRMFM06) para os estudos.

Discos de micélios (5 mm) das bordas de colônias cultivadas por 7 dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h foram transferidos para placas de Petri com 20 mL de BDA. Os isolados foram incubados nas temperaturas 4, 10, 15, 20, 22, 25, 28, 32 e 35 °C com fotoperíodo de 12 h, durante oito dias, em câmara B.O.D.

O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições por isolado e por tratamento. Na avaliação do crescimento micelial, fez-se a medição, a cada 24 h, de dois diâmetros opostos. Foi considerado o término do ensaio assim que um dos tratamentos atingisse as bordas da placa (90 mm).

Os dados de crescimento micelial foram avaliados pelo índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) calculado pela fórmula de MAGUIRE (1962) adaptada por Oliveira (1991):  $IVCM = \sum (D - D_a) / N$ , em que D = Diâmetro médio atual,  $D_a$  = Diâmetro médio do dia anterior, e N = Número de dias após a inoculação.

A produção de conídios foi realizada no 11º dia de incubação, acrescentando a cada placa 2 mL de água destilada esterilizada. Com uma alça esterilizada fez-se a raspagem da superfície das colônias desenvolvidas e o número total de conídios produzidos por placas foi contado em câmara de 'Neubauer', utilizando uma alíquota de 0,05 mL de cada suspensão.

Na germinação de conídios, três anéis de parafina foram fixados em cada lâmina, fundindo-se a parafina e imprimindo o anel com o auxílio de um frasco de penicilina. A seguir, 120 µL suspensão de conídios ( $10^4$  conídios. mL<sup>-1</sup>) de cada patógeno foram depositando-se no centro dos anéis de parafina em três diferentes lâminas de microscopia. As lâminas foram depositadas em caixas tipo 'gerbox'

contendo papel filtro umedecido, e incubado por 12 h nas temperaturas citadas no ensaio de crescimento micelial. Cada suspensão foi constituída de três repetições (uma lâmina de microscopia) em delineamento inteiramente casualizado. A germinação dos conídios foi determinada pela contagem de 100 conídios por amostra ao microscópio ótico. Foi considerado germinado o conídio que apresentava tubo germinativo maior ou igual ao comprimento do conídio.

Após a finalização do ensaio, as placas de Petri e as lâminas dos isolados que estavam na temperatura de 4 °C foram levadas à temperatura de  $25 \pm 2$  °C para verificar se haveria algum crescimento micelial e alguma germinação.

As análises estatísticas dos resultados foram feitas para delineamento inteiramente casualizado para nove tratamentos e quatro repetições pelo programa Assistat versão 7.4 Beta utilizando o teste estatístico Tukey 5% para comparação de médias (SILVA et al., 2001).

### **3.2.2.2 Crescimento micelial e a capacidade de esporulação em diferentes meios de cultivo**

Verificou-se o crescimento micelial dos patógenos em cinco diferentes meios de cultura BDA, EFMA, MDA, SMA e AvA. Para o preparo do meio EFMA, foram feitas infusões feitas de folhas verdes ( $17 \text{ g.L}^{-1}$ ), em água destilada, fervidas durante 15 min e após, adicionado ágar ( $16 \text{ g.L}^{-1}$ ). Para o meio MDA, 250g de maçãs foram cozidas em água destilada e após o cozimento foi separado o caldo, o qual foi adicionado  $17 \text{ g.L}^{-1}$  de dextrose e  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar. Para o meio SMA, foi adicionado  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar em suco industrializado de maçã e para o meio AVA, foi adicionado  $40 \text{ g.L}^{-1}$  de farinha de aveia,  $16 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar em água destilada. Todos os meios foram autoclavados a 120 °C por 20 minutos e após vertidos em placas de Petri.

Discos de micélios (5 mm) das bordas de colônias cultivadas por 7 dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h foram transferidos para placas de Petri com 20 mL de BDA.

As análises estatísticas dos resultados foram feitas para delineamento inteiramente casualizado para cinco tratamentos e quatro repetições pelo programa

Assistat versão 7.4 Beta utilizando o teste estatístico Scott-Knott a 5 % para comparação de médias (SILVA et al., 2001).

### **3.2.2.3 Crescimento micelial em diferentes valores de pH**

Verificou-se o crescimento micelial dos patógenos em onze diferentes valores de pH. Discos de micélios (5 mm) das bordas de colônias cultivadas por 7 dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h foram transferidos para placas de Petri com 20 mL de BDA, as quais tiveram o pH ajustado para os seguintes valores: 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,8; 7,0; 7,5; 8,0 e incubadas a 25 ± 2 °C com fotoperíodo de 12 h. Para obter os valores de pH abaixo de 6,8 (testemunha) foi adicionado HCL e para os valores acima de 6,8 foi adicionado NaOH.

Os dados de crescimento micelial foram avaliados pelo índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) calculado pela fórmula de MAGUIRE (1962) adaptada por Oliveira (1991):  $IVCM = \sum (D - D_a) / N$ , em que D = Diâmetro médio atual,  $D_a$  = Diâmetro médio do dia anterior, e N = Número de dias após a inoculação.

As análises estatísticas dos resultados foram feitas para delineamento inteiramente casualizado para onze tratamentos e quatro repetições pelo programa Assistat versão 7.4 Beta utilizando o teste estatístico Scott-Knott a 5% para comparação de médias (SILVA et al., 2001).

## **3.2.3 Teste de patogenicidade**

### **3.2.3.1 Teste de Patogenicidade em frutos**

Foram utilizados frutos sadios da cultivar Gala, desinfestados com álcool 70 % (30 s), hipoclorito de sódio a 0,5 % (3 min) seguidos de tríplice lavagem com água destilada esterilizada. Foram realizados dois métodos de inoculação. No primeiro, quinze frutos foram inoculados aspergindo-se uma suspensão de conídios ( $10^4$  conídios. mL<sup>-1</sup>), correspondendo a 1 mL de suspensão/fruto. O outro método foi pela forma direta, colocando-se um disco de micélio (5 mm) de bordas de colônias cultivadas

a 7 dias a 25 °C sob fotoperíodo de 12 h sobre quinze frutos sem ferimento. Inicialmente, os frutos foram acondicionados em câmaras úmidas com 100 % de umidade a  $22 \pm 2$  °C no escuro, por 24 h. Após este tempo, os frutos permaneceram no mesmo local sob luminosidade constante, até o aparecimento dos sintomas. A testemunha foi inoculada com água destilada esterilizada em um dos ensaios e no outro sem a presença dos discos de micélios.

Foram realizadas avaliações de incidência e severidade (número de lesões por fruto) nos frutos, bem como foi considerado o tipo da lesão por cada isolado sendo: 1) característica da Mancha das Folhas (lesão pequena) ou; 2) Podridão Amarga (lesão grande e abaulada).

As análises estatísticas dos resultados foram feitas para delineamento inteiramente casualizado utilizando-se pelo programa Assistat versão 7.4 Beta utilizando o teste estatístico Scott-Knott a 5% para comparação de médias (SILVA et al., 2001).

### **3.2.3.2 Teste de Patogenicidade em folhas**

Foram utilizadas folhas saudáveis de plantas da cultivar Gala, desinfestadas com álcool 70% (30 s), hipoclorito de sódio a 0,5% (3 min) seguidas de tríplice lavagem com água destilada esterilizada. As folhas foram inoculadas com uma aspersão de suspensão de conídios ( $10^4$  conídios. mL<sup>-1</sup>), sendo aplicado 1mL de suspensão/folha e acondicionadas em caixas tipo 'gerbox' com 100 % de umidade e mantidas no escuro por 24 h a  $22 \pm 2$  °C. Após este tempo, os 'gerbox' com as folhas foram mantidos na mesma condição, porém sob luminosidade constante, até o aparecimento dos sintomas. A testemunha foi inoculada com água destilada e mantida sob as mesmas condições das demais caixas inoculadas com os isolados de *Colletotrichum* spp.

A avaliação considerou o número de lesões e a área da lesão em cada folha. Para a avaliação da área da lesão foi usado o programa Quant (VALE et al., 2003), utilizando-se fotos digitalizadas de cada folha. As análises estatísticas dos resultados foram feitas para o delineamento experimental inteiramente casualizado, sendo que cada 'gerbox' representou uma repetição pelo programa Assistat versão 7.4 Beta

utilizando o teste estatístico Scott-Knott a 5% para comparação de médias (SILVA et al., 2001).

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Isolamento

Foram obtidos 11 isolados de patógenos causadores da MFM, sendo 5 das amostras procedentes do município de Campo Largo, 2 do município de Quatro Barras, 1 do município de Porto Amazonas e 3 do município da Lapa (TABELA 1).

Como mostra a Tabela 1, tanto nas folhas como nos frutos foram obtidos isolados de *C. gloeosporioides*, *G. cingulata* e *C. acutatum*. Houve uma predominância de *C. acutatum* (5 isolados), *C. gloeosporioides* (3 isolados), *G. cingulata* (3 isolados).

TABELA 1 - Isolados patogênicos de mancha das folhas de macieira indicando a localidade, o órgão vegetal do qual foi isolado e a identificação

<b>Código</b>	<b>Localidade</b>	<b>Órgão Vegetal</b>	<b>Identificação*</b>
UFPRMFM01	Campo Largo	Folha	<i>C. gloeosporioides</i>
UFPRMFM02	Campo Largo	Folha	<i>C. gloeosporioides</i>
UFPRMFM03	Campo Largo	Fruto	<i>G. cingulata</i>
UFPRMFM04	Campo Largo	Fruto	<i>C. gloeosporioides</i>
UFPRMFM05	Campo Largo	Folha	<i>G. cingulata</i>
UFPRMFM06	Quatro Barras	Folha	<i>G. cingulata</i>
UFPRMFM07	Quatro Barras	Fruto	<i>C. acutatum</i>
UFPRMFM08	Porto Amazonas	Folha	<i>C. acutatum</i>
UFPRMFM09	Lapa	Folha	<i>C. acutatum</i>
UFPRMFM10	Lapa	Folha	<i>C. acutatum</i>
UFPRMFM11	Lapa	Fruto	<i>C. acutatum</i>

\* Confirmação da identificação dos fungos foi realizada na Clínica Fitopatológica da Universidade Federal de Viçosa.

### 3.3.2 Caracterização fisiológica

#### 3.3.2.1 Crescimento micelial, produção e germinação de conídios em diferentes temperaturas.

A temperatura ótima para o desenvolvimento dos três isolados variou entre 22 °C e 28 °C, apresentando o máximo índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) na temperatura de 22 °C para o isolado *G. cingulata* (GC) (TABELA 2). Houve diferença significativa entre as temperaturas e entre os isolados utilizados no experimento, principalmente nas temperaturas de 22, 25 e 28 °C (TABELA 2). Nas temperaturas de 22 °C e 25 °C não houve diferença significativa para *C. acutatum* (CA), *C. gloeosporioides* (CG). Quanto ao IVCM (TABELA 2), a *Glomerella cingulata* apresentou o maior índice entre os demais isolados. A figura 1 representa a curva do IVCM, indicando o maior crescimento de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *G. cingulata* na temperatura 28, 25 e 22 °C, respectivamente.

TABELA 2 - Índice de velocidade do crescimento micelial (IVCM) para *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC), agentes etiológicos da MFM submetidos a diferentes temperaturas. Curitiba, PR, 2007.

Temperatura(°C)	IVCM		
	C.A	C.G	G.C
4	0,0050 dA	0,0050 eA	0,0050 fA
10	0,0163 dA	0,0000 eA	0,1168 fA
15	0,6348 cA	0,7313 dA	0,7175 dA
20	1,1868 bB	1,0933 cB	1,5653 bA
22	<b>1,4763 aB</b>	1,4893 bB	<b>2,0545 aA</b>
25	<b>1,4708 aB</b>	1,3668 bB	1,8920 aA
28	0,1483 dB	<b>1,6983 aA</b>	1,6100 bA
32	0,1218 dB	0,1290 eB	1,2063 cA
35	0,0000 dB	0,0050 eB	0,3818 eA
CV%	11,509	11,509	11,509

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade

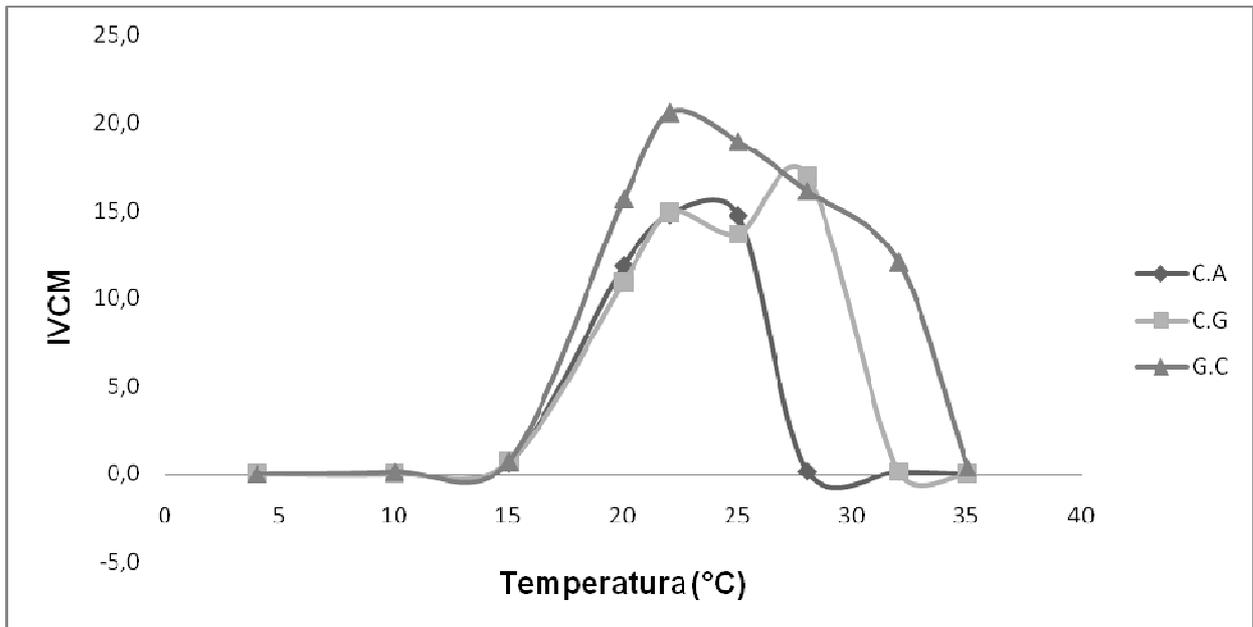


FIGURA 1 - Índice de velocidade do crescimento (IVCM) para *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC), agentes etiológicos da mfm submetidos a diferentes temperaturas. Curitiba, PR, 2007.

De acordo com a Tabela 3, houve diferença significativa na produção de conídios para as diferentes temperaturas testadas. Para o isolado CA, a melhor temperatura para produção de conídios foi de 25 °C, com  $(14 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1})$  para CG  $(19,75 \times 10^6$  esporos  $\text{mL}^{-1})$  a temperatura ótima foi de 28 °C (TABELA 3). Houve diferença significativa para a germinação dos conídios entre as temperaturas. A máxima germinação foi obtida na temperatura de 25 °C, onde o isolado CA obteve 89 % de germinação e o isolado de CG obteve 87 % de germinação (TABELA 3).

No ensaio de produção e germinação de esporos, a GC, não formou ascósporos e, portanto não foi utilizada. Os isolados de *Colletotrichum* spp. não apresentaram diferença significativa quanto à temperatura ótima para germinação conidial.

A figura 2 representa a curva da produção de conídios, indicando a maior produção de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* na temperatura 28 e 25 °C, respectivamente. Na figura 3, a curva da germinação de conídio indica a temperatura de 25 °C como a temperatura ótima de germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum*.

TABELA 3 - Produção e porcentagem de germinação de conídios para *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA), agentes etiológicos da MFM submetidos a diferentes temperaturas. Curitiba, PR, 2007.

Temperatura (°C)	Produção de Conídios (10 <sup>6</sup> .mL <sup>-1</sup> )		Germinação de Conídios (%)	
	CA	CG	CA	CG
4°C	0,00 dA	0,00 eA	0,00 dA	0,00 fA
10 °C	0,00 dA	0,00 eA	3,33 dA	3,00 efA
15 °C	<b>11,00 abA</b>	6,00 dB	10,33 cA	4,67 eB
20 °C	<b>9,00 bA</b>	11,00 cA	36,00 bA	12,00 dB
22 °C	1,62 cdA	1,32 eA	40,33 bA	23,67 bB
25 °C	<b>14,00 aA</b>	15,00 bA	<b>89,33 aA</b>	<b>87,67 aA</b>
28 °C	4,00 cB	<b>19,75 aA</b>	2,33 dA	4,33 efA
32 °C	3,25 cdB	6,50 dA	1,33 dB	18,67 cA
35 °C	0,00 dA	1,25 eA	0,00 dB	3,33 efA
CV %	5,32	5,14	4,21	3,73

\*Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e pela mesma letra maiúscula nas linhas, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

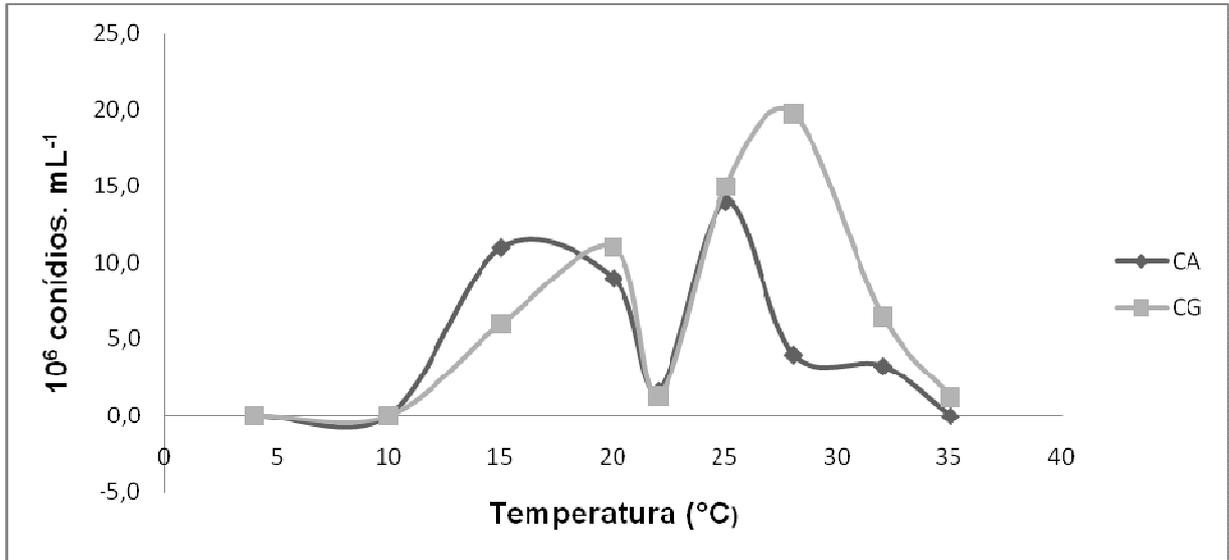


FIGURA 2 - Produção de conídios ( $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>) para *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA), agentes etiológicos da MFM submetidos a diferentes temperaturas. Curitiba, PR, 2007.

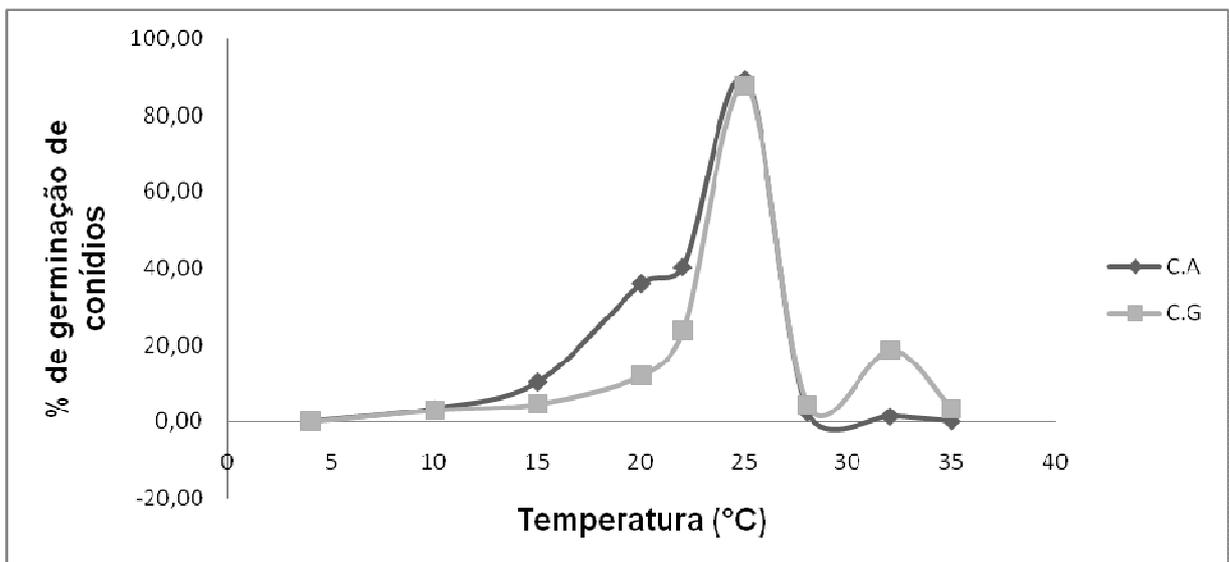


FIGURA 3 - Porcentagem de germinação de conídios ( $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup>) para *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA), agentes etiológicos da mfm submetidos a diferentes temperaturas. Curitiba, PR, 2007.

### 3.3.2.2 Crescimento micelial e a capacidade de esporulação em diferentes meios de cultivo.

Foi observado que o IVCM do isolado CA foi maior em meio SMA, intermediário em MDA e AVA e menor em BDA e EFMA (TABELA 4). Quanto ao isolado CG, o IVCM foi maior nos meios SMA, MDA, BDA, e para o isolado GC, o IVCM foi maior nos meio BDA, MDA e SMA não havendo diferença estatística entre eles Três meios de cultura puderam ser diferenciados, em base dos crescimentos dos isolados patogênicos, que são: os de crescimento mais rápido, obtidos pelos meios MDA, SMA, e BDA, e o de crescimento lento, obtidos pelos meios EFMA e AVA.

Em relação à capacidade de esporulação dos isolados, observa-se na Tabela 4 que para o isolado CA, o melhor meio de cultura foi o EFMA, seguidos pelo AVA e MDA, sendo que os dois últimos não diferenciaram estaticamente entre si, mas diferenciaram estatisticamente do EFMA. Para o isolado CG, todos os meios se diferenciaram estatisticamente entre si, sendo o BDA o melhor meio, seguido pelo AVA e EFMA. Para o isolado de GC, não foi realizado o experimento devido à falta de estruturas reprodutivas, ascósporos, para a avaliação do ensaio.

TABELA 4 - Crescimento micelial medido com o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) e a esporulação ( $10^6$  conídios.mL<sup>-1</sup>) de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG), *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC) em diferentes meios de culturas. Curitiba, PR, 2007.

Tratamentos	CA		CG		GC	
	IVCM	$10^6$ conídios.mL <sup>-1</sup>	IVCM	$10^6$ conídios.mL <sup>-1</sup>	IVCM	$10^6$ conídios.mL <sup>-1</sup>
SMA	<b>2,31 a</b>	3,33 c	<b>1,63 a</b>	4,00 d	<b>1,55 a</b>	-
MDA	1,78 b	21,00 b	<b>1,60 a</b>	3,67 d	<b>1,69 a</b>	-
EFMA	1,24 d	<b>36,67 a</b>	1,02 c	8,67 c	1,19 c	-
BDA	1,47 b	7,33 c	<b>1,36 a</b>	<b>15,00 a</b>	<b>1,89 a</b>	-
AVA	1,49 c	23,33 b	1,27 b	13,00 b	1,38 b	-
CV%	6,67	12,48	8,51	12,00	8,44	

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade. SMA (Suco de Maçã Ágar), MDA (Maçã Dextrose Ágar), EFMA (Extrato de Folha de Macieira Ágar), BDA ( Batata Dextrose Ágar) e AVA (Aveia Ágar).

### 3.3.2.3 Crescimento micelial em diferentes valores de pH.

Na Tabela 5 encontram-se os resultados do crescimento micelial em diferentes valores de pH. Os resultados mostraram que não há diferença significativa no valor de pH a 6,8 para todos os isolados patogênicos testados. Pode-se verificar que com valores de pH baixos, há menor índice de velocidades de crescimento micelial (IVCM) para *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *G. cingulata*. Contatou-se, também, que para os valores de pH básico, há uma diminuição de IVCM para os três patógenos.

A figura 4 representa a curva do IVCM em diferentes valores de pH, indicando o maior IVCM de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *G. cingulata* no pH de 6,8.

TABELA 5 - Crescimento micelial medido através do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella cingulata* em diferentes valores de pH. Curitiba, PR, 2007.

Valor de pH	IVCM		
	<i>C. acutatum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>G. cingulata</i>
3,0	0,113 i	0,673 i	0,476 d
3,5	0,360 h	0,686 i	0,556 d
4,0	0,816 g	0,906 h	0,753 c
4,5	1,096 f	1,020 g	1,000 b
5,0	1,216 e	1,106 f	1,173 b
5,5	1,286 e	1,260 e	<b>1,440 a</b>
6,0	1,463 d	1,350 d	1,243 b
6,5	1,646 c	1,506 c	<b>1,356 a</b>
<b>6,8</b>	<b>1,866 a</b>	<b>1,723 a</b>	<b>1,590 a</b>
7,0	1,770 b	1,593 b	<b>1,470 a</b>
7,5	1,733 b	1,546 c	<b>1,303 a</b>
8,0	1,460 d	1,240 e	1,136 b
CV%	3,588	2,90	10,65

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

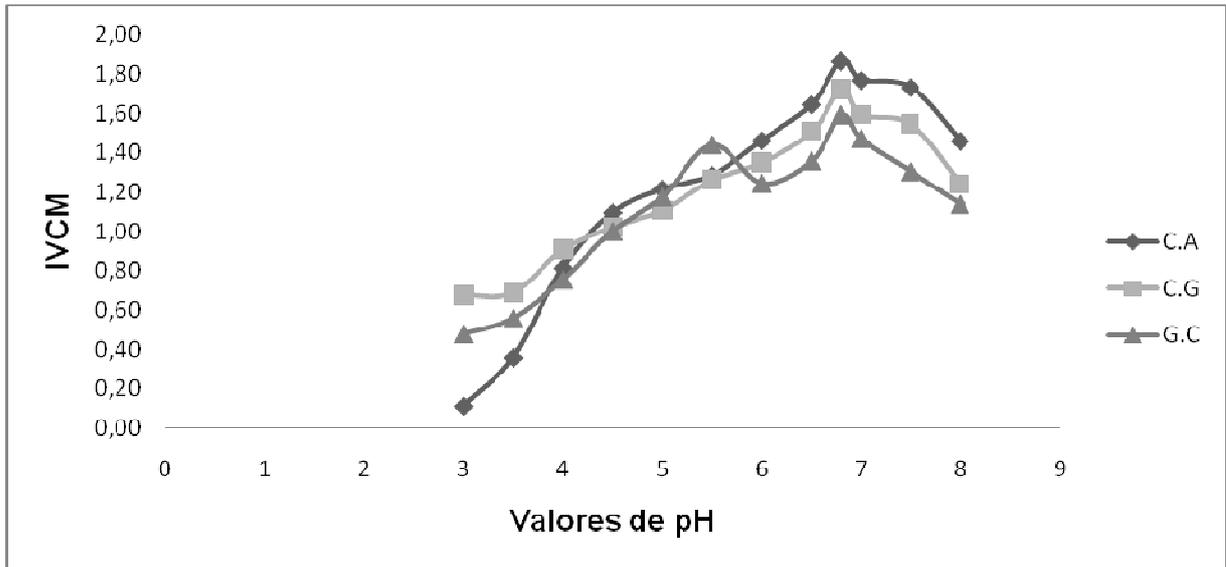


FIGURA 4 - Crescimento micelial medido através do índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) de *Colletotrichum acutatum* (CA), *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e *Glomerella cingulata* (GC) em diferentes valores de pH. Curitiba, PR, 2007.

### 3.3.3 Teste de patogenicidade

Sintomas de mancha das folhas e de podridão amarga foram observados nos frutos da cultivar Gala. Houve diferença estatística entre os isolados testados, sendo que o *C. gloeosporioides* proporcionou o maior número de lesões em frutos (TABELA 6). Verificou-se, também, que a inoculação indireta foi mais efetiva em proporcionar os sintomas do que a inoculação direta. Na inoculação direta não houve formação de nenhum sintoma, tanto para mancha das folhas como para podridão amarga. Na Tabela 6, observa-se que houve aparecimento de sintomas entre os isolados testados, havendo diferença estatisticamente da testemunha.

Foram observados em folhas destacadas da cultivar Gala Mancha das Folhas da Macieira (MFM), com lesões de coloração marrom, bem definidas e às vezes com margens marrom avermelhadas. Foi verificado, também, que não houve diferença estatística entre os isolados testados tanto para o número e área das lesões (TABELA 6).

TABELA 6 - Teste de patogenicidade em frutos e folhas medido através do número e área (mm<sup>2</sup>) de lesões pela inoculação (10<sup>4</sup> conídios.mL<sup>-1</sup>) de *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum*. Curitiba, PR, 2007.

Isolado	Frutos	Folhas	
	nº de lesões	nº de lesões	área total
<i>C. acutatum</i>	1,466 b	3,625 b	70,947 b
<i>C. gloeosporioides</i>	11,933 c	4,250 b	83,695 b
testemunha	0,000 a	0,000 a	0,000 a
CV%	23,03	24,82	25,04

\*As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Scott-Knott ao nível de 5 % de probabilidade.

### 3.4 DISCUSSÃO

No ensaio de crescimento micelial em diferentes temperaturas, estes resultados estão de acordo com DENNER, et al., (1986), que em experimento realizado obteve temperatura ótima de 28 °C para o crescimento do *C. gloeosporioides*. Acima de 30 °C e abaixo de 10 °C, o crescimento foi retardado e não houve crescimento em 40 °C e em 5 °C. De acordo, com GONZÁLEZ e SUTTON, (20 05), trabalhando com *G. cingulata* e *C. gloeosporioides* de macieira nos Estados Unidos tiveram praticamente a mesma temperatura ótima para crescimento que foi de 24,0 e 24,2 °C, respectivamente. Este resultado difere para os dados obtidos encontrados, principalmente para a *G. cingulata*. Para *C. acutatum* a melhor temperatura foi de 22,0°C o que, também, difere do resultado encontrado. A temperatura de 14 °C foi a menos favorável para todas as espécies sendo que o crescimento chegou a ser reduzido em quase 70 % se comparado com o da temperatura ótima.

Sabendo-se da variabilidade que os isolados de *Colletotrichum* spp. possuem entre si e que numa caracterização cultural, o fator de velocidade da taxa de crescimento pode influir diretamente na diferenciação dos isolados. De acordo com os dados obtidos, *C. acutatum* e *G. cingulata* podem ser diferenciados do *C. gloeosporioides*, pois tiveram um crescimento bem mais rápido.

GUNNELL e GUBLER, (1992), KURAMAE-IZIOKA, et al., (1997), SHI et al., (1996), TALHINHAS et al., (2002) relataram que *C. gloeosporioides* e *G. cingulata* podem ser diferenciados pela característica de possuir uma rápida taxa de crescimento, e o *C. acutatum* tem mostrado crescimento mais lento numa mesma temperatura.

Em estudo com diferentes isolados de *Coffea arabica* na região de Minas Gerais, a temperatura ótima para o maior IVCM entre os diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. variou entre 22 e 28 °C (DIAS et al., 2002). FEITOSA et al. (1977) determinaram, por meio de regressão, a temperatura de 28 °C como o ponto de máximo crescimento para isolados de *Colletotrichum* sp. provenientes do cafeeiro. Os dois últimos autores observaram incremento no crescimento com a elevação da temperatura até 28 °C, e a temperatura ótima de crescimento dependeu do isolado, ocorrendo entre 25 °C e 30 °C.

Quanto ao crescimento micelial dos isolados que estavam na temperatura de 4 °C e foram transferidos para a temperatura de 25 °C houve uma velocidade de crescimento com o mesmo patamar da temperatura de 22 °C. A temperatura de 4 °C encontra-se próxima à limítrofe para o crescimento dos isolados, por causar redução drástica no crescimento micelial; no entanto, essas temperaturas não foram letais ao patógeno. A temperatura de 22 °C foi considerada a melhor temperatura de crescimento para os três isolados, sendo a segunda melhor, a temperatura de 25 °C. Segundo ROTEM (1978), temperaturas extremas ou limítrofes são responsáveis por retardar o início da epidemia ou ainda atuam de maneira direta nos seus componentes, como, por exemplo, aumentando o período latente e de incubação.

Em relação à produção de conídios, os resultados concordaram com SLADE et al., (1987) que mostrou a melhor faixa de temperatura para produção de conídios de *C. gloeosporioides* entre 28 e 32°C. Ainda de acordo com o experimento, pode-se inferir que abaixo dos 10°C e acima dos 35°C há mínima produção de conídios chegando a ser nula. Segundo DIAS et al., (2002), a temperatura ótima, também, foi de 25 °C para produção de conídios de isolados provenientes de sintoma de mancha manteigosa do café, apresentando, também, variação quanto à temperatura ótima para esporulação, ficando entre 23 °C e 25 °C.

Quanto à germinação de conídios, ESTRADA et al., (2000), confirmaram, também, a temperatura de 25 °C como a melhor temperatura para germinação conidial de *C. gloeosporioides*, em experimento realizado na cultura da manga. Resultados semelhantes foram obtidos por DENNER, et al., (1986) que mostraram como a temperatura afeta a germinação dos esporos de *C. gloeosporioides in vitro*. A germinação dos esporos do patógeno ocorreu na faixa de temperatura de 10 – 35 °C. Foram obtidos resultados semelhantes para outros isolados de *Colletotrichum* spp. (ISHIDA e AKAI, 1969; MIELE e LUKEZIC, 1972).

Quanto ao crescimento e esporulação em diferentes meios de cultura, podem-se dividir os meios em dois tipos: um, que propicia um rápido crescimento micelial e outro que propicia um lento crescimento micelial. Esta divisão deve-se as diferentes substâncias nutritivas e fatores físicos como: pH, temperatura e luminosidade que induzem o crescimento micelial em espécies de *Colletotrichum* (GRIFFIN, 1993). Os meios, BDA, SMA e MDA, tinham substâncias nutritivas, como carboidratos, mais disponíveis para os fungos facilitando assim o crescimento micelial. Em oposição, nos meios que havia uma fonte nutricional mais complexa, EFMA e AVA, o fungo pode ter produzido enzimas para disponibilizar os nutrientes para seu crescimento. Com isso, também, houve um maior gasto de energia para essa disponibilização do que nos meios de crescimento micelial rápido. Isso foi comprovado por GRIFFIN (1993), estudando a fisiologia dos fungos, onde se constatou que fungos crescendo em meios contendo fonte complexa de carbono e de nutrientes, gastavam mais energia do que aqueles que cresciam em meio sintético com os requisitos nutricionais disponíveis.

O grande número de conídios produzidos pelo isolado de *C. acutatum* nos meios EFAM e AVA se deve a complexidade dos constituintes dos meios, que favoreceram a esporulação e o baixo crescimento micelial. Em contrapartida, o meio BDA, meio de crescimento micelial rápido, foi o que proporcionou a maior esporulação para o isolado de *C. gloeosporioides*. GRIFFIN (1993) relatou que certos fungos repicados várias vezes para meio sintéticos onde há fácil disponibilidade de nutrientes e fonte de carbono simples, quando repicado para meios de cultura com fonte de carbono mais complexa, apresentaram uma lentidão em produzir enzimas degradantes de

componentes complexos, fazendo assim crescerem lentamente atrasando o processo de esporulação.

O meio EFMA para *C. gloeosporioides* ficou em terceiro lugar em esporulação e para *C. acutatum* foi o primeiro, indicando que o *C. acutatum* tem um maior incremento para degradar substâncias complexas. Vários trabalhos foram desenvolvidos utilizando-se diferentes substâncias nutritivas e fatores físicos para indução de esporulação de espécies de *Colletotrichum* (SINGH e GARRAWAY, 1975, ROY 1977, RAJAK, 1983 e SINGH et al.1987). SHUKLA (1972), trabalhando com *C. gloeosporioides*, verificou a ação estimulante de vitaminas, principalmente biotina, tiamina e riboflavina, sobre a produção de esporos. RAYAK (1983) obteve máxima esporulação de *C. gloeosporioides* quando utilizaram meios de cultura contendo ramnose e arabinose como fontes de carbono, enquanto que SINGH et al. (1987) provaram ser a maltose a melhor fonte de carbono. Com isso, o uso de substrato natural, além de bastante eficiente para propiciar elevada produção de esporos é de fácil preparo e de uso mais simples em trabalhos laboratoriais rotineiros (SOAVE et al. 1975; SILVA et al. 1991).

Sobre o pH, pouco pode ser comentado sobre os efeitos do íon hidrogênio sobre o crescimento de fungos e em específico sobre espécies de *Colletotrichum*. Apesar de limitações em estudos pode-se dizer que a maioria dos fungos cresce bem quando o pH inicial do meio de cultura é ajustado no intervalo de 4 – 7 (GRIFFIN, 1993). Para os isoaldos de *Colletotrichum* verificou-se que a faixa de crescimento ficou entre 6,5 – 7,5, tendo seu máximo crescimento na faixa de 6,8 (TABELA 5). Essa faixa representa a faixa do meio de cultivo, BDA, sem haver modificação, representando a testemunha. Notou-se que quanto mais ácido ficava o meio de cultura menor o índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM). Isso pode acontecer, quando os fungos alteram o pH do meio de cultura drasticamente durante o crescimento, devido a diferenciais na absorção de cátions e ânions do meio e da secreção de H<sup>+</sup> durante o transporte de substrato (GRIFFIN, 1993). Assim, quando os fungos cresceram em pH acima de 7,0, houve, também, uma redução no IVCM de cada patógeno, porém os valores de IVCM foram maiores em relação aos valores mais baixos do pH.

Através das figuras 1, 2, 3 e 4, infere-se que os fungos durante sua fase de desenvolvimento são influenciados pela temperatura e pelo pH. Nota-se que para a produção de conídio (FIGURA 2) não há dependência com a temperatura devido à abertura e diferentes elevações da curva indicando que os fungos produzem conídio em diferentes temperaturas. Quando se verifica a curva da germinação de conídio (FIGURA 3) acontece o contrário do verificado com a curva de produção de conídio, pois essa é altamente dependente da temperatura devido ao estreitamento e elevação da curva na temperatura de 25 °C. O crescimento micelial (FIGURA 1) é considerada dependente moderada, pois possui maior estreitamento e elevações da curva em comparação com a curva da produção de conídio. Não somente a temperatura influencia o desenvolvimento dos fungos como também o pH. Isso foi comprovado e representado pela Figura 4, mostrando que há uma moderada dependência do pH para o crescimento dos três fungos, indicando uma elevação da curva no valor de 6,8.

Quanto à patogenicidade, os sintomas foram observados com 72 horas sob umidade relativa de 100 % ou seja, este tempo foi suficiente para que ocorresse a germinação dos conídios e a penetração do patógeno no tecido foliar. Resultado similar ao encontrado por HAMADA (2006), ao testar a patogenicidade de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de pomares de macieira, de diversas regiões produtoras do Brasil, em folhas e frutos de cultivar resistente (Fuji) e suscetível (Gala), onde em 48 horas de período de molhamento foliar (PMF) sob umidade relativa de 100% foram observados os primeiros sintomas de MG nas folhas da cv. 'Gala'.

Comparando o patossistema *Colletotrichum* x *Malus domestica* com outros patossistemas tais como *Coffea arabica* x *C. gloeosporioides* (CHEN, 2002), *Pinus radiata* x *C. acutatum* f. sp. *pineae* (NAIR et al., 1981), *Carica papaya* x *C. gloeosporioides* (CHAU et al., 1983), os processos que ocorrem após a germinação até o aparecimento dos sintomas, ou seja, a presença de maior severidade e número médio de lesões, apresentam variação de tempo, sendo considerados bastante específicos, dependendo do genótipo da planta e do hospedeiro testado.

Apesar do isolado de *C. acutatum* causar lesões típicas de podridão amarga em frutos, entretanto, em folhas da cultivar 'Gala' ocasionaram numerosas lesões necróticas de pequeno tamanho que ao final do ensaio não tinham evoluído de

tamanho, sete dias após a inoculação. Estas lesões necróticas foram semelhantes como as descritas por HAMADA (2006) e por KATSURAYAMA e BONETI (2001)

HAMADA (2006) corroborou com CRUSIUS (2000) e CARVALHO et al. (2000) no fato que somente o isolado de *C. gloeosporioides* foi patogênico em frutos da cultivar. Gala causando sintomas típicos de mancha das folhas. Porém, todos os isolados provenientes de lesões necróticas de mancha das folhas classificados como *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *G. cingulata* reproduziram os sintomas de manchas das folhas de macieira em folhas.

CARVALHO et al., (2000) e CRUSIUS (2000) relataram que isolados de *C. acutatum* são conhecidos por ocasionarem lesões típicas de podridão amarga, em frutos de macieira, ou seja, lesões concêntricas apresentando massa de conídios de coloração salmão distribuída ao longo da lesão. Em ensaios de inoculação artificial em frutos de macieira, DENARDI et al. (2003), observaram sintomas de podridão amarga após 10 dias de incubação à temperatura de 25 °C e umidade relativa de aproximadamente 100 %. Nesses trabalho, o isolado de *C. acutatum* formou pequenas pontuações necróticas, semelhante às observadas no material coletado a campo.

HAMADA (2006) confirmando resultados de KATSURAYAMA e BONETI (2001) atestou que estas lesões necróticas, reproduzidas em inoculação artificial tanto em folhas quanto em frutos verdes diferem dos sintomas, até então conhecidos, causados por espécies do gênero *Colletotrichum* em maçã. A confirmação dos sintomas através do postulado de Koch comprova que esses isolados foram capazes de causar sintomas até então desconhecidos na cultura. Entretanto, quando inoculados em frutos maduros de ambas as cultivares testadas, os isolados ocasionaram lesões de Podridão Amarga. Com isso, há indícios de que exista resistência ontogênica, ou seja, de acordo com o estágio de desenvolvimento dos frutos ocorre a maior ou menor resistência ao patógeno (HAMADA, 2006).

### 3.5 CONCLUSÕES

- Foram obtidos 11 isolados patogênicos de folhas e frutos de macieira, destes 45,5 % eram *Colletotrichum acutatum*, 27,2 % eram *Colletotrichum gloeosporioides* e 27,3 % *Glomerella cingulata*.
- Para o crescimento micelial, as melhores temperaturas para *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella cingulata* foram de 28°C, 25°C e 22° respectivamente. Na produção de conídios, 28°C foi a temperatura que obteve a melhor produção de conídios para *C. gloeosporioides* e 25°C para *C. acutatum* e a porcentagem de germinação, 25°C apresentou a melhor taxa de germinação tanto para *C. gloeosporioides* quanto para *C. acutatum*.
- Os meios de cultivos sintéticos, SMA, MDA e BDA, foram os que proporcionaram um melhor crescimento micelial possuindo uma faixa de IVCM entre 1,57 – 1,83, enquanto que os meios de cultivo naturais, EFMA e AVA, proporcionaram uma melhor produção de conídios entre uma faixa de 18,2 – 22,7  $10^6$  conídios. mL<sup>-1</sup> entre os isolados testados.
- A melhor faixa de pH para crescimento dos três isolados patogênicos da Mancha das Folhas ficou entre 6,5 – 7,5.
- Os isolados patogênicos testados foram capazes de causar sintomas da Mancha das folhas em folhas e frutos de macieira da cultivar 'Gala'.

### 3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y. **Doenças da Macieira São Paulo**: BASF, 1998.

BONETI, J.I. da S.; KATSURAYAMA, Y.; BLEICHER, J. **Doenças Fúngicas Foliares**. In: EPAGRI. A Cultura da Macieira. Florianópolis, 743p., 2002.

CANNON, P.F.; BRIDGE, P.D.; MONTE, E. **Linking the past, present and future of *Colletotrichum* systematics**. In.: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. American Phytopathological Society, St Paul, MN. 2000.

CARVALHO, F.M.S.; LEITE Jr., R.P; UENO, B. **Pathogenic characterization of *Colletotrichum* spp. associated with apple diseases in southern Brazil**. *Fitopatologia Brasileira*, 25 (1): 72-78. 2000.

CHAU, K.F.; ALVAREZ, A.M. **A histological study of anthracnose on *Carica papaya***. *Phytopathology* 73(8): 1113-1116. 1983.

CHEN, Z. **Morphocultural and pathogenic comparisons between *Colletotrichum kahawae* and *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from coffee berries**. Tese (Doutorado em Engenharia Agrônômica) – Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, Portugal. 163p.,2002.

CRUSIUS, L.U. **Epidemiologia da Mancha Foliar da Macieira**. Passo Fundo, UPF, 2000. Tese de Mestrado. 58p.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. **Resistência genética à Podridão Amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos**. *Revista Brasileira de Fruticultura* 25 (3): 494-497. 2003.

DENNER, F.D.N., KOTZÉ J. M. & PUTTERILL J. F. **The effect of temperature on spore germination, growth and appressorium formation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Dothiorella aromatica***. *S. Afr. Avocado Grws. Assc. Yrbk.* 9: 19 – 22. 1986.

DIAS, M. D. **Efeito da temperatura no crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *Colletotrichum* spp. isolados de *Coffea arábica***. *Ciência Agrotec*, v. 29, n. 3, p. 545-552, 2005.

ESTRADA, A. B.; DODD, J. C.; JEFFRIES, P. **Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of**

**the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*.** Plant pathology, Honolulu, v. 49, p. 608-618, 2000.

FEITOSA, M. I.; FEICHTENBERGER, M.; KUDAMATSU, M.; ROSSETTI, V.; LEITE, R. **Estudos sobre a população de *Colletotrichum* em *Coffea arabica* L, no Estado de São Paulo.** Arquivo do Instituto Biológico, São Paulo, v. 44, n. 1/2, p. 33- 54, jan./jun. 1977.

GONZÁLEZ, E., & SUTTON, T. B. **Differentiation of isolates of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum* spp. associated with *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apples using growth rate, response to temperature, and benomyl sensitivity.** Plant Health Progress, (No. July) 1-9, 2005.

GRIFFIN, D.H. **Fungal Physiology.** 2. ed. New York: State University of New York, 1993.

GUNNEL, P. S. & GUBLER, W. D. **Taxonomy and morphology of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry** Mycologia, 84: 157-165, 1992.

HAMADA, N. A. **Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira.** 106p. Dissertação ( Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2006.

ISHIDA, N. & AKAI S. **Relation of temperature to germination of conidia and appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*.** Mycologia 61, 382 – 386, 1969.

JEFFRIES, P.; DODD, J.C.; JEGER & PLUMBIEY, R.A. **The biology and control of *Colletotrichum* sp. on tropical fruit crops.** Plant Pathology, 39: 343-366, 1990.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & OZAWA, T. **Sobrevivência de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da mancha foliar da gala.** Fitopatologia brasileira, 25 (suplemento):383 (Resumos), 2000.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. da S. & BECKER, W.F.; OZAWA, T. & TSUCHIYA, S. **Epidemiologia das Doenças da Macieira no Subtropical e Perspectivas de Manejo Integrado: Caso da Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.)**. In: SEMINÁRIO SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO: Perspectivas da Fruticultura de Clima Temperado na Região Subtropical: Estratégias e Tecnologias para a Sustentabilidade da Fruticultura de Baixo Impacto Ambiental, 1., 2001. Florianópolis, SC. Anais. Florianópolis, Epagri, 161p. 2001.

KURAMAE-IZIOKA, E. E., LOPES, C. R., SOUZA, N. L., AND MACHADO, M. A. 1997. **Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* spp. from citrus orchards affected by postbloom fruit drop in Brazil**. Eur. J. Plant Pathol. 103:323-329.

LOPEZ, A. M. Q. **Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*** in Revisão Anual de Patologia de Plantas, Passo Fundo. Volume 9: 291-339, 2001.

MAGUIRE, J.D. **Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor**. Crop Science, Chicago, v.2, n.2, p.176-177, Apr./Jun. 1962

MIELE, B.R. & LUKEZIC, F.L, 1972. **Studies on conidial germination and appressorium formation by *Colletotrichum trifolii***. Can. J. Microbiol. 18, 1263 - 1269.

NAIR, J.; CORBIN, J.B. **Histopathology of *Pinus radiata* seedlings infected by *Colletotrichum acutatum* f. sp. *pineae***. Phytopathology 71(8): 777-783. 1981.

ROTEM, J. **Climate and weather influence on epidemics**. In: HORSFALL, J. G.; DIMOND, A. E. Plant disease: how disease develops in populations. New York: Academic, 1978. p. 317-436.

ROY, A. K. **Effect of nitrate nitrogen on growth and sporulation of *Colletotrichum dematium* (Pers. ex Frs) Grov**. Journal of the India Botanical Society. 56 (4): 278-280, 1977.

SHI, Y., CORRELL, J. C., AND GUERBER, J. C. **Frequency of Colletotrichum species causing bitter rot of apples in the southeastern United States.** Plant Dis. 80:692, 1996.

SHUKLA, D.S. **Studies on the growth and sporulation of Colletotrichum gloeosporioides in relation to vitamins.** Indian Phytopathology. 25(2): 300- 302, 1972.

SILVA, F. de A. S. & AZEVEDO, C. A. V. de. **A New Version of The Assistat-Statistical Assistance Software.** In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural Engineers, 2006. p.393-396.

SILVA, M.F.; LIMA, D.M.M.; CAVALCANTI, M.A. **Indução da esporulação de culturas de Colletotrichum gloeosporioides Penz. preservadas em óleo mineral.** Pesq. Agropec. Bras., 26(11/12): 2021-2024, 1991.

SINGH, R. D. & GARRAWAY, M. O. **Role of trace elements in the growth and sporulation of Colletotrichum lagenarium.** India Phytopathology, 28 (4): 468-475, 1975.

SINGH, R. D.; SHARMA, B.M.; KAUSHAL, S.C. **Studies on growth requirements and sporulation of Colletotrichum gloeosporioides Penz. isolated from Citrus sinensis (L.).** Osbeck Research Bulletin Panjab. Univ. Science, 38(1/2): 83-86, 1987.

SLADE, S. J.; HARRIS, R. F.; SMITH, C. S.; ANDREWS, J. H. **Microcycle conidiation and sporecarrying capacity of Colletotrichum gloeosporioides on solid media.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 53, n. 9,p. 2106-2110, 1987

SOAVE, V.; GALLI, F.; KIMATI, H. **Estudo do crescimento vegetativo e da esporulação de Pyricularia oryzae Cavara em diferentes meios de cultura.** Summa Phytopatologia, 1: 187-197, 1975.

SUTTON, B.C. **The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum***. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) *Colletotrichum – Biology, Pathology, and Control*. Wallingford. CAB International. pp. 1-26. 1992

TALHINHAS, P., SREENIVASAPRASAD, S., NEVES-MARTINS, J., AND OLIVEIRA, H. **Genetic and morphological characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of lupins**. *Phytopathology* 92:986-996, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. & BETTI, J.A. **Doenças da macieira (*Malus* spp.)** In: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A. (Ed) *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Agronômica Ceres, 421-433, 2005.

VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I. & LIBERATO, J.R. **QUANT. A software plant disease severity assessment**. 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, 2003. p.105.

#### 4 CAPÍTULO II - SELEÇÃO DE ISOLADOS BACTERIANOS RESIDENTES DE FILOPLANO DE MACIEIRA VISANDO O BIOCONTROLE DA MANCHA DAS FOLHAS DA MACIEIRA

##### RESUMO

No Brasil a mancha das folhas da macieira é causada, pelos os fungos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella cingulata*, e é a principal doença dessa cultura no Estado do Paraná, sendo responsável por danos na produção devido à desfolha precoce que causa na cultura após a colheita. As medidas de controle recomendadas, como remoção de material infectado e uso de fungicidas não têm sido suficientes para o manejo da doença principalmente em pomares em sistema de produção integrada. No presente trabalho, investigou-se o potencial de isolados bacterianos residentes de filoplano de macieira como biocontroladores desta doença. Para tanto, amostras de partes de filoplano de macieiras sadias foram coletadas em pomares comerciais na região metropolitana de Curitiba. As amostras foram submetidas à extração de sua flora epifítica por lavagem do filoplano e semeadura de diluições do lavado em meio de cultura. Dessa maneira foram obtidas 142 culturas de isolados bacterianos residentes de filoplano, onde 12 isolados foram obtidos como contaminantes durante o processo do isolamento dos patógenos. A seleção massal foi realizada com 137 pela combinação dos dados obtidos de ensaios *in vitro*, sendo avaliados: a inibição da germinação de conídios, o crescimento micelial, a formação de mancha em folhas destacadas e a produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis. Após a seleção, os isolados foram avaliados em campo em relação à prevenção da infecção por *C. acutatum* em mudas de macieira, quantificando-se latência e incidência. Combinando os resultados da seleção massal, foram escolhidos 17 isolados de acordo com os seguintes critérios: 80 a 100 % de inibição de germinação e área de crescimento micelial menor que 90 mm<sup>2</sup>. No campo, foi observada diferença significativa entre sete isolados bacterianos e testemunha para o período de latência e incidência, sendo os isolados de folhas A19, A131, A132 (Campo Largo), A68, A69 (Porto Amazonas), A135 e A137(Quatro Barras) os mais eficientes no

controle da doença chegando a inibir a incidência em 36% . Tais isolados devem ser avaliados a partir deste trabalho dentro de sistemas de manejo da doença no campo.

**Palavras- chaves:** bactérias, antibiose, *Colletotrichum* spp. *Malus domestica*,

## SELECTION IN VITRO ON ISOLATED PROKARYOTES RESIDENTS OF PHYLLOPLANE OF APPLE TREE AIMING THE BIOCONTROL OF GLOMERELLA SPOT OF LEVES OF APPLE TREE

### ABSTRACT

Glomerella Leaf Spot of the apple tree, caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* and *Glomerella cingulata* fungus, are the main disease of this culture in the Paraná being responsible for damages in the production. The recommended measures of control, as removal of infected material and use of fungicides have not been efficient. In the present work, it was investigated possibility of biological control of the disease for the use of isolated bacterial residents of phylloplane. For in such a way, samples of parts of phylloplane of healthy apple trees had been gotten in collections carried through in commercial plantations in the region metropolitan of Curitiba. The samples had been submitted to the extration of its epiphitic flora for laudering of the phylloplane and sowing of dilutions of the washed one in culture media. In this way 142 isolated cultures of bacterial residents of filoplano had been gotten. The massal election was carried through by the combination of the gotten data of assays in vitro, being evaluated: the inhibition of the conidial germination, the micelial growth, the formation of spot in detached leves and the thermostable and volatile antifungal composite production. After the election, the isolated ones had been evaluated in field in relation to the prevention of the infection for *C. acutatum* in apple tree changes, quantifying itself latency and incidence. Combining the results of the massal election, isolated ones had been chosen 17 considering itself above of 80 100% of inhibition of germination and area of micelial growth lesser that 90 mm<sup>2</sup>. In the field, by the analysis distribution free, significant difference between seven isolated bacterial ones was observed and testifies for the period of latency and incidence, however, for significant severity did not have leaf difference being the isolated ones A19, A131, A132 (Campo Largo), A68, A69 (Porto Amazonas), A135 and A137 (Quatro Barras) most efficient in the control of the disease.

**Keywords:** bacteria, antibiose, *Colletotrichum* spp. *Malus domestica*

## 4.1 INTRODUÇÃO

Dentre os diversos agentes bióticos que podem ser utilizados em controle biológico, as bactérias do filoplano são uma alternativa ainda pouco explorada, principalmente quando comparadas às rizobactérias (LINDOW e LEVEAU, 2002) e esta diferença se deve, em grande parte, às características do habitat onde cada um se encontra. O termo filoplano adotado por LAST e DEIGHTON (1965), considerava a verdadeira superfície foliar, já que anteriormente o termo filosfera, adotado por LAST (1955) em analogia à rizosfera descrevia a superfície das folhas. A população microbiana residente desse habitat é muito complexa em sua constituição e diversidade de eventos (KINKEL et al., 1996; KINKLE, 1997). O filoplano é um habitat natural para microrganismos e, muitos deles podem apresentar, potencialidade como agentes de controle biológico de enfermidades (BAKER e COOK, 1974; BLAKEMAN e FOKKEMA, 1982).

Com isso, microrganismos com comprovada eficiência antagônica devem ter sua população aumentada na superfície da planta visando o biocontrole da doença alvo. Além disso, obter antagonistas com maior capacidade de sobrevivência pode ser um fator que determine sua efetividade em condições de campo. As bactérias do filoplano utilizam basicamente dois tipos de estratégias para sobreviverem em ambientes de estresse, de tolerância e de escape. A primeira requer capacidade em tolerar condições inóspitas, tais como a incidência de radiação ultravioleta, baixa umidade, enquanto a segunda, considera a habilidade da bactéria em explorar sítios que ofereçam um ambiente menos sujeito a estresses ambientais (ANDREWS e HIRANO, 1991; BEATTIE e LINDOW, 1995; BEATTIE e LINDOW, 1999; WILSON et al., 1999).

Alguns autores obtiveram isolamentos da parte aérea de plantas e os testaram para o biocontrole de enfermidades também na parte aérea da própria espécie vegetal de onde foram isolados (JIMÉNEZ et al., 1988; SANDOVAL et al., 1988; SUDO, 1989; MICHEREF et al., 1994b; KORSTEN et al., 1995; MIZUBUTI et al., 1995; PABITRA et al., 1996; BETTIOL, 1997; KONG et al., 1997; LEITE et al., 1998; CARRER FILHO et

al., 1999; HALFELD-VIEIRA et al., 2000; ROMEIRO et al. 2000a). As chances de obtenção de microrganismos efetivamente antagonísticos são aumentadas fazendo-se isolamentos do ambiente onde serão usados tornando-se adaptados a sobreviver e crescer nesse local. Para um organismo ser bem sucedido no controle biológico deve ter a capacidade de se multiplicar e colonizar o filoplano da planta (BLAKEMAN e FOKKEMA, 1982, ANDREWS, 1992). Assim, um processo de seleção de antagonistas visando o controle da mancha das folhas da macieira, causada por *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *C. acutatum* J.H. Simmonds, poderia ser mais eficiente utilizando antagonistas que habitem folhas, frutos, caules, gemas e flores de macieira.

Este trabalho teve como objetivo selecionar bactérias isoladas de filoplano de macieira para o biocontrole da mancha das folhas da macieira. Para tanto, foram realizados ensaios de antagonismo *in vitro* onde foi avaliada a capacidade de cada isolado em inibir a germinação de conídios, crescimento micelial dos patógenos, produzir compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis e voláteis e inibir a formação de manchas em folhas destacadas de macieira. E, ensaios *in vivo* onde foi avaliada a capacidade dos isolados em inibir a infecção de mudas de macieira pelo fungo *C. acutatum*.

## **4.2 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.2.1 Obtenção dos isolados bacterianos residentes de filoplano**

Foram coletadas amostras de órgãos aéreos de macieiras sadias nos municípios de Campo Largo, Lapa e Porto Amazonas, no Estado do Paraná. De cada planta coletou-se amostras de lançamentos vegetativos, folhagem completamente expandida, botões florais e frutos jovens. As amostras foram levadas ao Laboratório de Epidemiologia e Manejo de doenças da Universidade Federal do Paraná, de onde foi extraída a flora epifítica seguindo metodologia adaptada de ROMEIRO et al. (2000a). Para tanto, uma seção de cada amostra foi incubada sob agitação em solução salina (NaCl a 0,85%), na proporção de 6 ml da solução para cada grama de amostra, por 10 h à temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se diluições em séries, onde alíquotas

de cada série foram espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski em placas contendo meio 523 de KADO e HESKETT (1970) (sacarose, 10 g; caseína ácida hidrolizada, 8 g; extrato de levedura, 4 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g;  $\text{MgSO}_4 + 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,3 g; ágar 20 g; água destilada 1000 ml). Cada amostra foi semeada em duas placas, e essas incubadas por 24 h a 25 °C. Colônias individualizadas e diferentes morfologicamente foram transferidas para tubos de ensaio contendo o mesmo meio de cultura inclinado.

#### **4.2.2 Inibição de germinação de conídios de *Colletotrichum spp.* pelas bactérias residentes de filoplano**

Foi utilizada metodologia adaptada de MACAGNAN (2001), onde cada isolado bacteriano foi cultivado em meio líquido, 523 de KADO e HESKETT (1970), por 24 h, à temperatura de 25 °C, sob agitação e em seguida ajustadas em espectrofotômetro em absorbância igual a 0,3 em comprimento de onda de 540 nm. Posteriormente, três anéis de parafina foram fixados em cada lâmina, fundindo-se a parafina e imprimindo o anel com o auxílio de um frasco de penicilina. Suspensões dos antagonistas foram depositadas (120 µL) no centro de um dos anéis de parafina em três diferentes lâminas de microscopia utilizando como testemunha água destilada. Em seguida, suspensões de conídios de *Colletotrichum spp.* ( $10^4$  conídios.  $\text{mL}^{-1}$ ) foram misturadas a cada suspensão de antagonista. As lâminas foram depositadas em caixas tipo 'gerbox' contendo papel-filtro umedecido, incubando-se por 6h a 25 °C. Cada suspensão foi constituída de três repetições, sendo cada repetição representada por uma lâmina de microscopia em delineamento inteiramente casualizado.

Devido à impossibilidade de realização do teste com todos os potenciais antagonistas simultaneamente, estes foram realizados em tres etapas. A capacidade de inibição foi determinada pela contagem de 100 conídios por amostra ao microscópio ótico. A padronização dos dados foi feita em função do tratamento controle. Para tanto foi utilizada a seguinte fórmula: Porcentagem de inibição ou estímulo de germinação =  $[(\text{trat}/\text{test}) - 1] \times 100$ . Onde, "trat" representa a porcentagem de germinação de conídios observado no tratamento e "test" representa a porcentagem de germinação de conídios observada na parcela testemunha. Os resultados com valores negativos serão

considerados como inibidores da germinação e os resultados apresentando valores positivos como estimuladores da germinação (MACAGNAN, 2001).

#### **4.2.3 Inibição de crescimento micelial**

No centro de placas de Petri de 90 mm de diâmetro contendo meio BDA foi depositado um disco de micélio de *Colletotrichum* spp. e um residente de filoplano foi repicado, a partir de crescimento em meio sólido, para quatro pontos equidistantes na periferia da placa. A placa foi incubada a 25 °C por 10 dias sendo posteriormente avaliada a inibição do crescimento micelial. Após esse tempo, o crescimento foi avaliado usando o programa QUANT (VALE et al., 2003) para mensurar a área de crescimento micelial dos patógenos através de fotos digitalizadas das placas de Petri com os respectivos tratamentos.

#### **4.2.4 Produção de compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis.**

Cada um dos antagonistas foi cultivado em frascos de Erlenmeyers contendo meio líquido 523 de KADO e HESKETT (1970), por 24 h sob agitação. Após a incubação, às culturas bacterianas foi adicionado ágar, e estas submetidas à autoclavagem por 20 min a 120 °C. Estas foram vertidas em placas de Petri que, depois de resfriadas, tiveram um disco de micélio dos fungos em teste depositado ao centro. Como controle, um disco de micélio foi transferido para uma placa de Petri contendo apenas o meio de cultura 523 sem incubação das bactérias. As placas foram incubadas e avaliadas quanto ao diâmetro da colônia quando até que o micélio do fungo da placa controle atingir as extremidades da mesma. A porcentagem de supressão no crescimento micelial do fungo (SCM) foi expressa pela fórmula  $(SCM)\% = [(DCC - DCT)/DCC] \times 100$  onde DCC= diâmetro da colônia do fungo na parcela controle e DCT= Diâmetro da colônia do fungo na parcela tratamento, conforme metodologia de MICHEREF et al. (1994a) e MACAGNAN (2001).

#### **4.2.5 Produção de compostos antifúngicos voláteis.**

Esta metodologia foi adaptada de MACAGNAN (2001), onde uma placa de Petri contendo meio de KADO e HESKETT (1970) foi semeada com antagonista e em outra, contendo meio BDA, foi depositado um disco de micélio do fungo em teste. As tampas foram removidas e as duas placas unidas, sendo seladas com filme de PVC. Como controle foi utilizado o mesmo conjunto mantendo-se o meio destinado ao cultivo do antagonista estéril. A avaliação consistiu na medida do diâmetro da colônia do fungo até este atingir as extremidades da placa no tratamento testemunha. A avaliação foi realizada conforme descrito no item 5.2.2.3.

#### **4.2.6 Bioensaio com folhas destacadas de macieira para seleção de bactérias residentes de filoplano de macieira.**

Este procedimento foi adaptado de PUSEY (1997 e 1999) trabalhando com o patossistema *Erwinia amylovora*-macieira, onde propágulos de células do antagonista na fase exponencial de crescimento foram suspensos em solução salina (0,85 %), com concentração ajustada para  $OD_{540nm} = 0,4$ . A suspensão foi então dispensada, por pulverização em folhas de macieira da cultivar Gala e depositadas em caixas tipo 'gerbox', forradas com papel-filtro esterilizado e umedecido, de forma a manter a umidade relativa elevada. Suspensões de conídios dos patógenos foram ajustadas para  $10^4$  conídios.  $mL^{-1}$  e pulverizadas sobre as folhas. Os "gerbox" foram colocados em B.O.D. a 22 °C, no escuro por 24 h. Após este período, as caixas foram colocadas em B.O.D. na temperatura de 25 °C com fotoperíodo de 12 h. Foram utilizadas duas folhas por 'gerbox' e três 'gerbox' por tratamento. Neste ensaio houve duas testemunhas, uma onde não houve aplicação dos isolados antagonísticos e outra com aplicação de fungicida a base de mancozebe (800 g.  $kg^{-1}$ ) conforme recomendação do fabricante. Cada repetição foi representada por uma folha. Foram avaliados o número e a área total das manchas. A área total foi medida usando o programa QUANT (VALE *et al.*, 2003), que mensurava as áreas das manchas por meio de fotos digitalizadas das folhas.

As análises estatísticas dos resultados foram feitas para o delineamento inteiramente casualizado sendo que cada 'gerbox' representou uma repetição pelo programa Assistat versão 7.4 Beta utilizando o teste estatístico Scott-Knott a 5% para comparação de médias (SILVA et al., 2001).

#### **4.2.7 Estratégia adotada para a seleção massal**

A seleção massal dos antagonistas foi realizada baseando-se em duas etapas. Na primeira etapa, todas as bactérias isoladas do filoplano de macieira foram testadas quanto à inibição de germinação de conídios e inibição do crescimento micelial dos três patógenos. Os resultados destes dois experimentos foram tabulados e a soma dos valores dos dados deu origem a um índice. O valor do índice que cada isolado apresentou foi maior na medida em que o antagonista apresentou maior capacidade antagonica nos dois ensaios ao qual foi submetido. Para isso, foi utilizada a porcentagem de inibição de 80 a 100% para inibição de germinação de conídios e, em relação a inibição de crescimento micelial, os valores de menor área de crescimento micelial foram adotados como valor positivo e os valores da área de crescimento micelial igual ao da testemunha (90 mm<sup>2</sup>) receberam um valor negativo.

Uma vez obtidos os índices da primeira etapa da seleção massal, selecionou-se um grupo de bactérias residentes de filoplano de macieira e estas foram submetidas à segunda etapa. Esse grupo de bactérias foi testado quanto à produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis, e, também, quanto à inibição de formação de manchas em folhas destacadas de macieira. Os resultados destes três experimentos foram tabulados e somados originando um índice. Foi selecionado como melhor antagonista, aquele que apresentava um somatório acima de 400. Para a produção de compostos antifúngicos termoestáveis e voláteis foram utilizados a porcentagem da supressão micelial dos três patógenos e para a inibição de formação de manchas foram utilizados os valores dos números e da área da macha por folha foram utilizados.

#### 4.2.8 Seleção final dos antagonistas

Os 17 isolados bacterianos selecionados na fase anterior do trabalho foram reavaliados em condições de campo, visando confirmar tanto a sua potencialidade no biocontrole da mancha das folhas, bem como estreitar o número de antagonistas. Para isso, foi realizado um experimento no mês de dezembro de 2007, no pomar de macieiras pertencente ao Departamento de Fitotecnia do Setor de Ciências Agrárias da UFPR. Foram testados os 17 isolados bacterianos obtidos na fase anterior e dois tratamentos controles: um, em que foi realizada a aplicação de fungicida a base de mancozebe (800 g. Kg<sup>-1</sup>) e outro com a aplicação de *Colletotrichum acutatum* (10<sup>4</sup> conídios. mL<sup>-1</sup>). Os ensaios foram montados seguindo blocos ao acaso, cada tratamento com cinco repetições totalizando 105 parcelas experimentais. Estas ficaram constituídas por uma muda de macieira enxertada a cultivar Gala sobre porta-enxerto Maruba. As mudas apresentavam idade aproximada de 50 dias e foram adquiridas no Viveiro Clone.

Os isolados bacterianos foram multiplicados em frascos de Erlenmeyers, contendo meio líquido de Nutriente-ágar (Extrato de carne 3 g, peptona 5 g, glicose 2,5 g e água destilada 1000 ml). Os frascos permaneceram incubados por um período de 48 horas à temperatura de 25 °C + 2. Após esse período, as células foram suspensas em solução de NaCl 0,85% + Tween 80 (uma gota/litro) tendo sua concentração padronizada, ao espectrofotômetro, para D.O.540= 0,2%. As mudas foram pulverizadas com a suspensão bacteriana em toda à sua superfície aérea com auxílio de um atomizador manual, até o ponto de escorrimento. Após esse procedimento, cada muda foi coberta com um saco plástico transparente para formar uma câmara úmida, a qual permaneceu por um período de quatro dias.

Quatro dias após a inoculação dos isolados bacterianos foi feita a inoculação do patógeno. Foi utilizada uma suspensão de conídios de *Colletotrichum acutatum* ajustadas para 10<sup>4</sup> conídios. mL<sup>-1</sup> e pulverizados sobre as folhas. Após esse procedimento, cada muda foi coberta, novamente, com um saco plástico transparente para formar uma câmara úmida, a qual permaneceu por um período de 72 h.

A avaliação quanto à incidência, severidade e ao período de latência foi realizada três dias após a inoculação com o patógeno. Ambos foram submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste estatístico Scott-Knott a 5% pelo programa Assistat versão 7.4 Beta (SILVA et al., 2001).

### **4.3 RESULTADOS**

#### **4.3.1 Isolamento de bactérias residentes de filoplano de macieira**

Foram obtidos 142 isolados de residentes de filoplano de macieira, sendo 45 obtidos das amostras procedentes do município de Campo Largo, 42 do município da Lapa, 43 do município de Porto Amazonas e os outros 12 obtidos em laboratório como contaminante de isolamentos de *Colletotrichum* spp. Dos 12 isolados obtidos em laboratório, quatro foram contaminantes de isolamentos de folhas procedentes de Campo Largo, um procedente da Lapa e sete de contaminantes de culturas de *Colletotrichum* spp. isolados de folhas do município de Quatro Barras.

Das folhas foi obtido o maior número de isolados (52 isolados), seguido pelos frutos (34 isolados), caule (21 isolados), botões florais (14 isolados) e gemas (nove isolados). Em relação aos 12 isolados contaminantes obtidos, oito isolados foram do isolamento do fungo partir de folhas e quatro a partir de frutos.

#### **4.3.2 Atividade de residentes de filoplano de macieira na germinação de conídios de *Colletotrichum* spp.**

A Figura 5 mostra a distribuição dos isolados em relação a atividade destes na germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *C. acutatum*. Pode-se observar que a grande maioria dos isolados apresentou atividade inibitória sobre a germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *C. acutatum*. Uma pequena minoria demonstrou alguma atividade de estimulação da germinação de conídios.

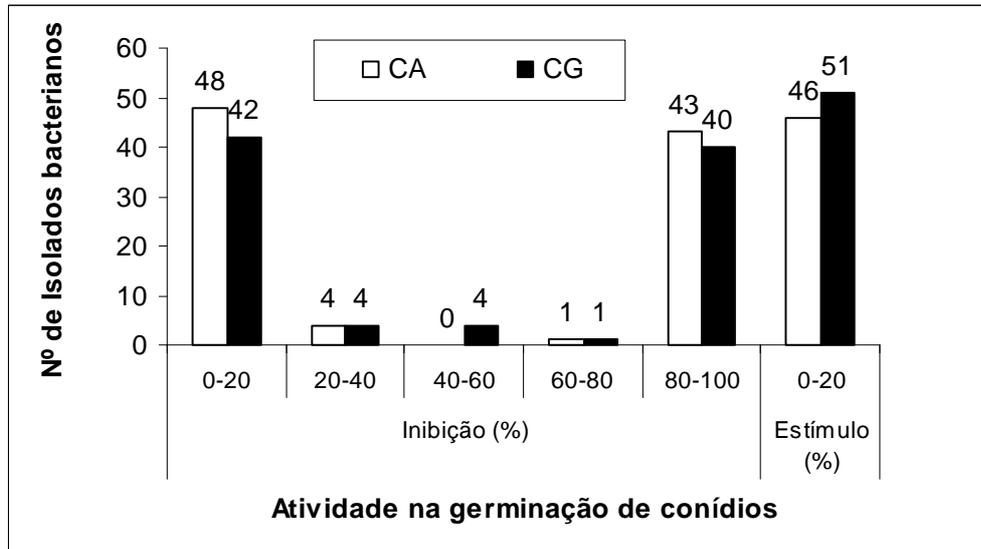


FIGURA 5 - Número de isolados de procaríotas residentes de filoplano de macieira com relação a sua atividade nas faixas de inibição (%) ou estimulação (%) da germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) E *C. acutatum* (CA). Curitiba, PR, 2007.

#### 4.3.3 Atividade de residentes de filoplano no crescimento micelial de *Colletotrichum spp.*

A maior parte dos isolados de residentes de filoplano de macieira não produziu substâncias capazes de inibir o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (84,5%), *C. acutatum* (72,5%) e *Glomerella cingulata* (83,8%). Uma pequena proporção dos isolados produziu substâncias antifúngicas inibidoras do crescimento micelial de *C. gloeosporioides* (15,5%), *C. acutatum* (27,5%) e *G. cingulata* (16,2) (FIGURA 6).

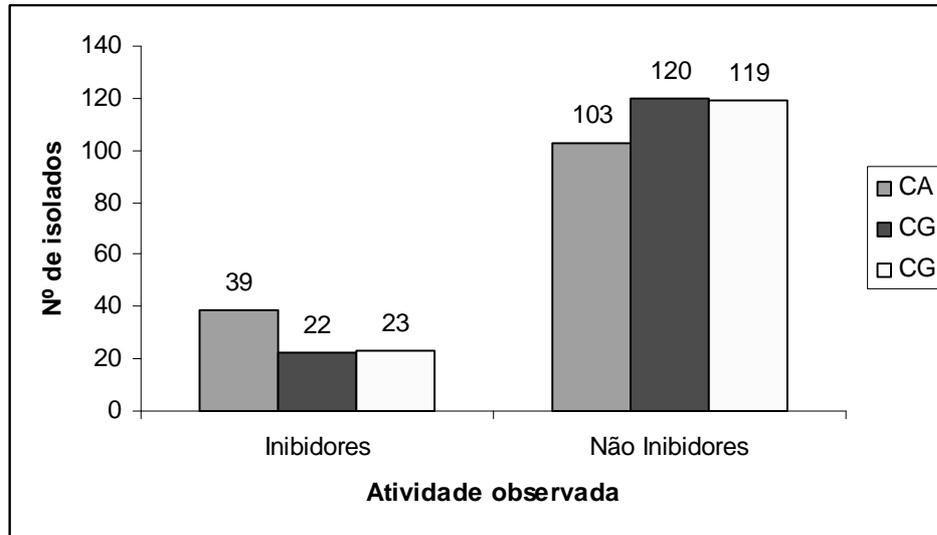


FIGURA 6 – Distribuição dos isolamentos de residentes de filoplano de macieira em relação a sua atividade contra o micélio *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) E *C. acutatum* (CA) E *Glomerella cingulata* (GC). Curitiba, PR, 2007.

Foram considerados como promissores os 19 isolados selecionados que apresentaram respostas de inibição de germinação e inibição de crescimento micelial para os três patógenos estudados (TABELA 7 - anexo). Nestes selecionados, o mecanismo de antibiose sobre o crescimento micelial dos três patógenos ficou evidente nos isolados bacterianos oriundos do município de Quatro Barras e as folhas e frutos foram os órgãos vegetais que estas bactérias residiam (TABELA 8 e 9).

TABELA 7 - Crescimento micelial médio (mm<sup>2</sup>) de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC) pelos isolados bacterianos selecionados na primeira etapa da seleção massal indicando a localidade de onde foi coletado as amostras. Curitiba, PR, 2007.

Localidade	CA	CG	GC
Campo Largo	49,9 a	51,2 a	48,3 ab
Porto Amazonas	51,2 a	53,7 a	57,7 a
Quatro Barras	42,0 a	42,6 b	40,6 b
CV%	11,9	11,1	14,9

\* Valores da área da colônia micelial, obtidos pelo programa Quant (VALE et al., 2003) em comparação a testemunha que obteve uma área de 90 mm<sup>2</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 8 - Crescimento micelial médio (mm<sup>2</sup>) de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC) pelos isolados bacterianos selecionados na primeira etapa da seleção massal indicando o órgão vegetal onde foram encontrados. Curitiba, PR, 2007.

Órgão Vegetal	CA	CG	GC
Fruto	46,09 ab	47,98 a	47,5 a
Caule	49,51 ab	47,8 a	47,9 a
Flor	52,75 a	55,9 a	50,7 a
Folha	44,4 b	46,1 a	44,8 a
CV%	9,8	11,3	17,8

\* Valores da área da colônia micelial, obtidos pelo programa Quant (VALE et al., 2003) em comparação a testemunha que obteve uma área de 90 mm<sup>2</sup>. Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

#### 4.3.4 Atividade de compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis e voláteis.

A análise dos dados provenientes dos ensaios visando a detecção de compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis mostrou-se positiva contra o crescimento micelial dos patógenos. Portanto, os antagonistas produzem este tipo de composto que

é depositado extracelularmente. Os isolados fúngicos apresentaram sensibilidade diferenciada aos compostos sintetizados pelos antagonistas (TABELA 10).

O teste visando a detecção de compostos antifúngicos voláteis evidenciou a produção deste tipo de composto por todos os antagonistas sendo todos os fungos sensíveis a estes compostos apresentando diferença significativa em relação a testemunha (TABELA 10).

TABELA 9 - Supressão de crescimento micelial (% SCM) DE *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC) por residentes de filoplano de macieira pela ação de compostos antifúngicos termoestáveis (CAT) e voláteis (CAV) produzidos. Curitiba, PR, 2007.

19 Isolados	Supressão de crescimento micelial (%)					
	CAT			CAV		
	CA	CG	GC	CA	CG	GC
A02	<b>93,50 a</b>	<b>93,66 a</b>	<b>94,4 a</b>	<b>93,50 a</b>	67,60 d	<b>94,40 a</b>
A06	42,23 f	26,83 e	<b>94,4 a</b>	80,93 b	72,60 c	<b>94,40 a</b>
A07	81,10 c	75,55 c	<b>94,4 a</b>	82,96 b	<b>89,10 a</b>	<b>94,40 a</b>
A19	32,20 g	27,23 e	36,5 d	<b>87,93 a</b>	49,23 e	<b>94,40 a</b>
A23	42,80 f	48,90 d	49,23 c	42,80 c	49,23 e	72,03 c
A24	43,13 f	49,80 d	<b>94,4 a</b>	<b>87,93 a</b>	49,33 e	<b>94,40 a</b>
A28	84,80 b	72,60 c	<b>92,76 a</b>	<b>87,36 a</b>	52,96 e	84,43 b
A68	75,16 e	86,60 b	<b>94,4 a</b>	74,80 b	<b>84,83 a</b>	<b>94,40 a</b>
A69	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	<b>85,53 a</b>	<b>87,23 a</b>	<b>94,40 a</b>
A103	77,60 d	77,06 c	82,96 b	78,86 b	76,50 b	83,33 b
A131	<b>92,36 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	83,33 b	<b>84,46 a</b>	<b>94,40 a</b>
A132	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	82,60 b	<b>84,53 a</b>	<b>94,40 a</b>
A133	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	<b>85,00 a</b>	77,76 b	<b>94,40 a</b>
A134	<b>94,40 a</b>	76,63 c	<b>94,4 a</b>	77,20 b	75,90 b	<b>94,40 a</b>
A135	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	<b>89,96 a</b>	<b>82,96 a</b>	<b>94,40 a</b>
A137	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	73,36 b	60,56 d	73,90 c
A138	<b>94,40 a</b>	<b>91,66 a</b>	86,06 b	<b>90,53 a</b>	66,66 d	86,08 b
A141	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	81,30 b	74,46 c	85,16 b
A142	<b>94,40 a</b>	<b>94,40 a</b>	<b>94,4 a</b>	79,80 b	62,76 d	<b>94,40 a</b>
CV %	6,78	8,43	5,64	4,41	3,87	1,82

\* As médias da coluna seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

#### 4.3.5 Bioensaio com folhas destacadas de macieira para seleção massal de residentes de filoplano.

Os resultados dos testes de atividade de isolados de residentes de filoplano na infecção de folhas de macieira por conídios de *Colletotrichum* spp. demonstraram que os antagonistas conseguiram impedir a infecção. Não houve diferença estatística entre os isolados bacterianos da testemunha com aplicação de fungicida. A distribuição do número de isolados em relação a sua atividade na formação de manchas em folhas destacadas de macieira está listada na Tabela 11.

TABELA 10 – Número e área total (mm<sup>2</sup>) das lesões em folhas de macieira inoculadas com *C. gloeosporioides* (CG) e *C. acutatum* (CA) tratadas com bactérias residentes de filoplano de macieira. Curitiba, PR, 2007.

Isolado	<i>C. acutatum</i>		<i>C. gloeosporioides</i>	
	nº de manchas	área total (mm <sup>2</sup> )	nº de manchas	área total (mm <sup>2</sup> )
A02	1,333 b	4,188 b	0,000 b	0,000 b
A06	1,333 b	4,187 b	1,166 b	3,665 b
A07	1,333 b	4,188 b	0,833 b	2,617 b
A19	1,500 b	4,709 b	1,166 b	3,561 b
A23	1,500 b	4,701 b	1,166 b	3,671 b
A24	1,666 b	5,225 b	1,500 b	4,713 b
A28	1,666 b	5,231 b	1,333 b	4,186 b
A68	1,333 b	4,196 b	1,166 b	3,655 b
A69	0,666 c	2,098 b	1,166 b	3,665 b
A103	0,166 c	0,524 b	1,000 b	3,141 b
A131	0,500 c	1,573 b	0,666 b	2,092 b
A132	0,166 c	0,524 b	0,833 b	2,096 b
A133	0,166 c	0,525 b	0,833 b	2,618 b
A134	0,666 c	2,098 b	0,833 b	2,615 b
A135	0,500 c	1,566 b	0,833 b	2,614 b
A137	0,333 c	1,046 b	0,833 b	1,047 b
A138	0,500 c	1,571 b	0,166 b	0,525 b

A141	0,333 c	1,049 b	0,833 b	2,615 b
A142	0,500 c	0,522 b	0,666 b	2,096 b
TEST 01	3,333 a	65,371 a	4,000 aA	78,515 a
TEST 02	0,000 c	0,000 b	0,000 b	0,000 b
CV %	4,40	23,13	5,46	17,61

\* As médias da coluna seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Test 01 – folhas não inoculadas com suspensão bacteriana; Test 02 – aplicações de fungicida a base de mancozebe (800 g.Kg<sup>-1</sup>)

Foram considerados como mais promissores os 17 isolados selecionados que apresentaram respostas de supressão de crescimento micelial pelos produtos antifúngicos termoestáveis e voláteis, além de, também, inibir a formação de manchas em folhas destacadas (TABELA 12). Nestes selecionados, houve, também, uma predominância para os isolados oriundos do município de Quatro Barras e as folhas e frutos foram os órgãos vegetais dos quais estas bactérias foram isoladas (TABELA 13 e 14).

TABELA 11 – Relação de isolados de antagonistas selecionados para o biocontrole da mancha das folhas de macieira a partir da combinação de resultados da produção de compostos antifúngicos termoestáveis (CAT) e voláteis (CAV), número e área total das manchas em folhas destacadas. Curitiba, PR, 2007.

Isolado	CAT	CAV	Nº de manchas	Área total (mm <sup>2</sup> )	Índice
A02	281,56	255,50	1,33	4,19	542,58
A06	163,46	247,93	2,50	7,85	421,74
A07	251,05	266,46	2,17	6,81	526,48
A19	95,93	231,56	2,50	8,27	338,26
A23	140,93	164,06	2,50	8,37	315,86
A24	187,33	231,66	2,83	9,94	431,76
A28	250,16	224,75	2,67	9,42	486,99
A68	256,16	254,03	2,50	7,85	520,54
A69	283,20	267,16	2,50	5,76	558,62
A103	237,62	238,69	2,33	3,67	482,31
A131	281,16	262,19	2,00	3,67	549,01
A132	283,20	261,53	2,17	2,62	549,52

A133	283,20	257,16	2,17	3,14	545,67
A134	265,43	247,50	2,17	4,71	519,81
A135	283,20	267,32	2,17	4,18	556,87
A137	283,20	207,82	2,17	2,09	495,28
A138	272,12	243,27	1,50	2,10	518,99
A141	283,20	240,92	2,17	3,66	529,95
A142	283,20	236,96	2,00	2,62	524,78

\*Foram selecionados isolados bacterianos que apresentaram um somatório total acima de 400.

TABELA 12 - Supressão de crescimento micelial (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC) pela ação de compostos antifúngicos termoestáveis (CAT) e voláteis (CAV) produzidos por 17 residentes de filoplano de macieira indicando a localidade de procedência. Curitiba, PR, 2007.

Localidade	CAT			CAV		
	CA	CG	GC	CA	CG	GC
Campo largo	71,65 <sup>ns</sup>	68,99 <sup>ns</sup>	83,99 <sup>ns</sup>	80,28 <sup>ns</sup>	70,57 <sup>ns</sup>	91,36 <sup>ns</sup>
Porto Amazonas	84,79	84,53	93,85	82,56	75,01	91,08
Quatro Barras	94,40	93,85	92,73	82,99	69,48	86,79
CV %	25,9	27,3	18,8	13,9	20,2	8,1

\*<sup>ns</sup> - Médias seguidas não significativa estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

TABELA 13 - Supressão de crescimento micelial (%) de *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) e *C. acutatum* (CA) e *Glomerella cingulata* (GC) pela ação de compostos antifúngicos termoestáveis (CAT) e voláteis (CAV) produzidos por 17 residentes de filoplano de macieira indicando o órgão vegetal de residência. Curitiba, PR, 2007.

Órgão Vegetal	CAT			CAV		
	CA	CG	GC	CA	CG	GC
Folha	86,05 <sup>ns</sup>	85,13 <sup>ns</sup>	88,61 <sup>ns</sup>	82,10 <sup>ns</sup>	76,19 <sup>ns</sup>	91,43 <sup>ns</sup>
Fruto	94,1	94,1	93,24	91,62	87,94	65,67
Caule	71,43	63,01	91,13	82,53	72,79	89,14
Flor	42,97	49,35	71,82	65,37	49,28	83,22a
CV %	13,9	27,2	18,8	13,3	20,2	8,1

\*<sup>ns</sup> - Médias seguidas não significativa estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5 % de probabilidade.

#### 4.3.6 Seleção final dos isolados bacterianos residentes de filoplano de macieira

No ensaio realizado visando à seleção final a partir dos 17 isolados bacterianos obtidos na seleção massal, não foi obtida diferença estatística entre os tratamentos para o período de latência e severidade (resultados não apresentados devido ao valor alto de coeficiente de variação). Houve diferença estatística entre isolados bacterianos para incidência, não sendo a anova uma opção confiável para esta análise (TABELA 15). Porém, na análise não paramétrica, o valor de p comparando os isolados bacterianos com as testemunhas mostrou que sete isolados bacterianos tiveram significância para latência e incidência, ao contrário da severidade. Na Tabela 16, encontram-se os valores de p para onze isolados bacterianos, os quais apresentaram incidência menor que a da testemunha sem aplicação dos isolados bacterianos (Test 01).

TABELA 14 – Período de latência (em dias) e incidência (%) da mancha das folhas da macieira em mudas sadias obtidas em ensaios realizados objetivando a seleção final de antagonistas pela da pulverização de mudas com antagonistas e posteriores inoculações com propágulos do patógeno. Curitiba, PR, 2007.

Isolados	Latência	Incidência (%)
A02	14,5 <sup>ns</sup>	11,5 b
A06	7,8	41,7 b
A07	14,5	13,4 b
A19	11,00	13,3 a
A28	13,3	31,3 a
A68	20,0	8,8 a
A69	11,8	18,6 b
A103	11,00	18,1 b
A131	14,0	10,4 b
A132	13,5	8,4 b
A133	14,5	11,5 b
A134	16,5	33,4 b
A135	13,0	9,9 b
A137	15,0	35,9 b
A138	9,5	15,8 a

A141	12,5	29,7 a
A142	5,0	21,0 b
Test 01	15,0	24,3 a
Test 02	9,8	14,8 b
CV%	44,15	43,96

\* As médias da coluna seguidas da mesma letra não diferiram entre si pelo teste de Scott-Knott a 5%.  
 Test 01 – folhas não inoculadas com suspensão bacteriana; Test 02 – aplicações de fungicida a base de mancozebe (800 g.Kg<sup>-1</sup>)

TABELA 15 – Valor de p comparado entre os isolados e a testemunha 01 (sem aplicação de antagonistas) e entre os isolados bacterianos e a testemunha 02 (aplicação de fungicida) para incidência, severidade e latência. Curitiba, PR, 2007.

Isolado	Valor de P comparado a Test 01			Valor de P comparado a Test 02
	Incidência	Severidade	Latência	Incidência
A02	0,1152	-	-	-
A07	0,1191	-	-	-
<b>A19</b>	0,0362*	0,1363	0,0007*	0,866
<b>A68</b>	0,0371*	0,8340	0,003	0,7094
<b>A69</b>	0,0395*	0,1354	0,00001*	0,9215
A103	0,0751	-	-	-
<b>A131</b>	0,0313*	0,4530	0,0026	0,7994
<b>A132</b>	0,0062**	0,8374	0,00001*	0,4067
<b>A135</b>	0,0327*	0,8530	0,00001)	0,5364
<b>A137</b>	0,0008 **	0,8747	0,0041	0,0953
A138	0,2421	-	-	-
test 01	-	-	-	0,00772***

#### 4.4 DISCUSSÃO

A partir dos resultados apresentados, foi possível inferir que, embora as bactérias componham o grupo de microrganismos que se encontra em maior diversidade e quantidade na superfície foliar (LINDOW e LEVEAU, 2002), apenas uma pequena parcela destes microrganismos tem papel na supressão de fitopatógenos. Este fato é comprovado por diversos trabalhos (KORSTEN et al., 1995; KONG et al., 1997; ROMEIRO et al., 2000; HALFELD-VIEIRA, 2002; HALFELD-VIEIRA et al., 2004:

VIEIRA JUNIOR, 2005; MACAGNAN, 2001) onde os autores demonstraram que a maioria dos isolados obtidos de filoplano não apresenta efeito contra os patógenos desafiantes e, em alguns casos podem até acentuar a severidade da doença (FERNANDO et al., 1994; HALFELD-VIEIRA, 2002; MACAGNAN, 2001). Estes fatos foram observados neste trabalho, pois, dos 142 isolados testados contra os patógenos, apenas 4,22% foram eficientes contra todos os patógenos testados.

Para muitos pesquisadores, a antibiose é o principal mecanismo responsável pela eficácia de controle de muitas doenças (KEMPF e WOLF, 1989; GUETSKY et al., 2002; JOCK et al., 2002) e deve ser considerado um critério de seleção (MONTESINOS et al., 1996). Testes de antibiose revelaram que o filoplano de macieiras sadias está associada uma comunidade de microrganismos, alguns dos quais, capazes de produzir compostos de efeito inibitório ao crescimento do micélio e a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* (*G. cingulata*) e de *C. acutatum*, conforme observado nas figuras 1 e 2. Resultados semelhantes foram obtidos por outros autores para outros patossistemas (SANDOVAL et al., 1988; MICHEREF et al., 1994b; KORSTEN et al., 1995; MIZUBUTI et al., 1995; KONG et al., 1997; MACAGNAN, 2001; VIEIRA JUNIOR, 2006).

Nos ensaios de atividade dos antagonistas sobre a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e de *C. acutatum* foi observado que a grande maioria dos isolados de residentes de filoplano estão incluídos na faixa de 0 a 20% de inibição ou favorecimento à germinação de conídios (FIGURA 5). Possivelmente, este fato de inibição possa ser explicado pelos estágios iniciais da germinação, quando o esporo absorve grandes quantidades de água (ALEXOPOULOS, et al., 1996) e com esta, metabólicos tóxicos, produzidos pelas bactérias. Há que se considerar também que, no método de germinação de esporos, há o contato direto do patógeno com o produto ou produtos tóxicos produzidos pela bactéria, sem barreiras físicas. Adicionalmente, o agente de biocontrole está vivo, o que possibilita a este produzir e excretar o composto tóxico continuamente, favorecendo e intensificando o efeito inibitório. Os isolados antagônicos não afetaram o comprimento e a largura dos conídios dos patógenos. Entretanto, foi verificado que os conídios dos fitopatógenos submetidos aos isolados antagônicos apresentavam murchamento e agrupamentos e os antagonistas que favoreceram a germinação, os conídios após a germinação apresentaram apressórios melanizados em

comparação com os das testemunhas. Isso se deve a materiais exógenos, tais como ácidos orgânicos que podem influenciar a germinação de esporos e sua diferenciação em apressórios (LOPEZ, 2001). Porém a melanização de apressórios é considerada um pré-requisito da patogênese em espécies de *Colletotrichum* (KATOH et al., 1988). A inibição de germinação de esporos por procariotas residentes de filoplano *in vitro* já havia sido observada por HETHERINGTON et al. (1995) os quais encontraram um isolado que suprimiu em 95% a germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides*. Também KONG et al. (1997), trabalhando com bactérias residentes de filoplano de girassol visando o biocontrole de *Alternaria helianthi*, verificaram que mais da metade dos isolamentos testados exercia alguma atividade antagônica ao fungo.

No ensaio de inibição de crescimento micelial, 15,5% dos isolados antagonistas provocaram forte inibição no crescimento micelial dos fitopatógenos (FIGURA 6). Embora, durante o pareamento, não tenha ocorrido sobreposição da colônia dos antagonistas sobre o fitopatógeno, observou-se escurecimento do micélio de *C. acutatum*, na região de influência dos possíveis metabólitos produzidos pelas bactérias. Exames ao microscópio óptico comum revelaram encurtamento das células e espessamento das paredes das hifas do patógeno, exposto na região de influência dos metabólitos. Isso, também, foi comprovado por KUPPER et al., (2003), utilizando isolados de *Bacillus* spp. para controle biológico de *C. acutatum* em citrus.

Os ensaios para detecção de compostos antifúngicos voláteis (TABELA 10) apresentaram os resultados positivos contra micélio de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *G. cingulata*, sendo que do total de antagonistas, dois deles inibiram completamente o crescimento micelial dos três patógenos. DENNIS e WEBSTER (1971), trabalhando com espécies de fungos do gênero *Trichoderma* determinaram, por meio de técnicas de cromatografia de gás, que estes organismos produziam compostos como acetaldeído, *n*propanol, acetato de isobutil, acetona entre outros. Esses mesmos autores verificaram que isolamentos de *Trichoderma* spp produtores dos compostos acima relatados inibiam o crescimento de outros fungos em condições experimentais. Desta forma, especula-se que os procariotas residentes de filoplano testados produzam compostos com propriedades semelhantes, uma vez que nos bioensaios realizados houve a inibição, quase que completa em alguns casos, do crescimento dos patógenos e estes

estavam separados dentro das placas onde foi realizado o ensaio. Para a identificação da(s) substância(s) produzida(s) pelos residentes de filoplano de macieira seria necessário o emprego de técnicas semelhantes às utilizadas por DENNIS e WEBSTER (1971).

Nos ensaios visando à detecção de compostos antifúngicos extracelulares termoestáveis, (TABELA 10) verificou-se que houve a produção de um composto com essas características. Dos 19 isolados pré-selecionados somente oito isolados foram eficientes em inibir o crescimento micelial dos três patógenos avaliados (TABELA 10). Especula-se que esse composto não seja de origem protéica em vista a sua termoestabilidade, pois esta não é uma característica associada a proteínas (LEHNINGER, 1976). Em relação a esse ensaio, BETTIOL e KIMATI (1990) ao estudarem o efeito de *B. subtilis* sobre *Pyricularia oryzae*, verificaram que a multiplicação da bactéria em meio líquido, com ou sem agitação constante, liberou metabólitos em concentrações suficientes para inibir completamente o crescimento micelial do *P. oryzae*, após um dia de incubação. Algo semelhante, também, foi verificado por KUPPER et al., 2003, ao testar a termoestabilidade de metabólitos produzidos por *Bacillus* spp. para biocontrole de *C. acutatum* em citrus.

O ensaio de inibição de manchas em folhas destacadas (TABELA 11) revelou que a maioria dos residentes aparentemente suprimiu o aparecimento de sintomas enquanto nenhum favoreceu o aparecimento, confirmando dados de GARCIA et al. (2006), de forma similar testaram, que em folíolos destacados de feijoeiro, se um isolamento de *Bacillus cereus* (UFV-172), previamente selecionado como agente de biocontrole de doenças do feijoeiro, era capaz de inibir, no filoplano, a germinação de conídios de *Phaeoisariopsis griseola*. No entanto, FERNANDO et al. (1994) indicaram que não se pode descartar a possibilidade de que alguns isolados favoreceram o aparecimento de sintomas como no ensaio de um isolado de *Pseudomonas* spp que aumentou a eficiência de infecção de um isolado de *Colletotrichum coccodes*, agente de controle biológico de uma planta invasora (*Abutilon theophrasti*). Esta observação indica que bactérias nativas do filoplano são capazes de interagir em fases específicas do desenvolvimento de patógenos foliares, podendo alterar sua fisiologia. No caso de *Colletotrichum* spp., as populações que estimularam a germinação dos conídios podem

ajudar a compensar o efeito inibitório que outras populações exercem e, de certa forma, atenuá-los.

Nos ensaios envolvendo os antagonistas e os conídios dos patógenos, tanto na avaliação da atividade na germinação dos conídios e como na inoculação de folhas destacadas, foi observada uma grande variabilidade nos resultados. Isso ressalta características intrínsecas associadas à germinação dos conídios quanto à bioquímica foliar modificada, em que um dano fisiológico ao tecido sempre resulta na ativação de infecções (LOPEZ, 2001).

Os ensaios a campo, objetivando a seleção final dos isolados bacterianos residentes de filoplano na formação de manchas em mudas de macieira (TABELA 15) revelaram que a maioria dos residentes estimularam o aparecimento de sintomas, enquanto poucos suprimiram seu aparecimento. A constatação de maior incidência da doença, em relação à testemunha, em alguns tratamentos, é atribuída à baixa incidência desta nas parcelas testemunha facilitando o aparecimento deste tipo de resultado. A não variabilidade no período de latência, em relação às testemunhas, é atribuída à aplicação por meio de formulações de células nuas e sabidamente, esta não é a condição ideal em que se deva aplicar estes isolados, tornando-se necessário o desenvolvimento de formulações que maximizem a sobrevivência e os efeitos dos isolados a campo e mesmo com o objetivo de distribuição, como um produto comercial.

Outra justificativa seria que o sítio de latência de *Colletotrichum* spp. é mais um fator comprometedor do sucesso do biocontrole desta doença por residentes de filoplano. Nos meristemas da planta, local de penetração do patógeno, normalmente há uma menor população microbiana associada, em função da limitada disponibilidade de nutrientes (BETTIOL, 1997). Nessas condições, a produção e o acúmulo de um composto capaz de impedir o estabelecimento do patógeno, pode ter acontecido após o estabelecimento deste. O rápido processo de penetração do patógeno é também um fator que dificulta o seu controle, pois de acordo com KÖHL e FOKKEMA (1998) o período de tempo que o antagonista dispõe para interagir com o patógeno é um fator importante para o sucesso do biocontrole. Porém, há evidências, de que o excesso de nutrientes exógenos também estimula o crescimento micelial (EMMETT e PARBERY, 1975), o qual é mais passível de antagonismo do que a estrutura dos apressórios. É

possível que aplicação de fertilizantes foliares não só represente uma estratégia de tonificação fisiológica, mas igualmente favoreça outras formas de desenvolvimento do inóculo de *Colletotrichum* sp., tornando-o suscetível ao antagonismo do filoplano e , portanto, suprima a penetração e colonização dos tecidos (MASABA e WALLER, 1992). Contudo, as análises não paramétricas que apresentaram significância para latência e incidência mostraram que para severidade não é confiável para essa avaliação. Porém quando se compara a testemunha em que foi aplicado o fungicida os isolados bacterianos se comparam ao fungicida aplicado, mostrando sua eficiência.

Os dados dos testes realizados em laboratório evidenciaram a diversidade de mecanismos de antagonismo e a síntese de diferentes compostos antifúngicos pelos antagonistas selecionados. A diversidade de mecanismos e a produção de diferentes compostos antifúngicos são indicadas pela variação na magnitude do antagonismo exercida pelos procariotas residentes de filoplano de acordo com o ensaio realizado (MACAGNAN, 2001). Com isso, procariotas residentes de filoplano de macieira, visando o biocontrole da mancha das folhas, apresentam potenciais a serem explorados, já que alguns desses organismos produzem compostos extremamente tóxicos a *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *G. cingulata* como visto nos ensaio para a detecção de compostos antifúngicos voláteis e termoestáveis (TABELA 11).

#### 4.5 CONCLUSÕES

- Cento e quarenta e dois isolados de bactérias residentes de filoplano de macieira foram obtidos, sendo 52 isolados obtidos de folhas;34 isolados obtidos de frutos, 21 isolados obtidos de caule, 14 isolados obtidos de botoes florais, nove isolados obtidos de gemas, oito isolados contaminantes do isolamento do patogeno em folhas e quatro isolados contaminantes do isolamento do patogeno em frutos.
- A partir dos 142 isolados bacterianos, 17 foram selecionados com base em cinco ensaios de antibiose *in vitro*, para testes *in vivo* em mudas de macieiras.
- Na avaliação a campo sete isolados foram considerados promissores para o biocontrole da MFM.

#### 4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MINS, C. W. & BLACKWEL, M. **Introductory Mycology**, 4<sup>o</sup> ed., New York, Wiley & Sons, Inc., 1996, 869p.

ANDREWS, J. H. **Biological control in the phyllosphere**. Annual Review of phytopathology, 30: 603 - 635, 1992.

ANDREWS, J.H. & HIRANO, S.S. (Eds.) **Microbial Ecology of Leaves**. New York. Springer-Verlag. 1991.

BAKER, K. F. & COOK, R. J. **Biological control of plant pathogens**, W. H. Freeman, San Francisco. 1974, 433 p

BEATTIE, G.A. & LINDOW, S.E. **The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves**. Annual Review of Phytopathology 33:145-172. 1995.

BETTIOL, W. **Biocontrole na filosfera: problemas e perspectivas**. Revisão Anual de Patologia de Plantas, 5: 59 - 97, 1997

BETTIOL, W., KIMATI, H. **Efeito de *Bacillus subtilis subtilis* sobre *Pyricularia oryzae* agente causal de bruzone do arroz**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.25, p.1165-1174, 1990.

BLAKEMAN, J. P. & FOKKEMA, N. J. **Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane**. Annual Review of Phytopathology, 20: 167-192, 1982.

CARRER FILHO, R., ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., ARAUJO, J. C. A. & MIZUBUTI, E. S. G. **Residentes de filoplano e sua potencialidade no biocontrole de enfermidades da parte aérea do tomateiro**. Fitopatologia Brasileira, 24: 247, 1999.

DENNIS, C. & WEBSTER, J. **Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II Production of volatile antibiotics.** Transactions of the British Mycological Society, 57: 41- 48, 1971.

EMMETT, R.W. & PARBERY, D.G. **Appressoria.** Annual Review of Phytopathology 13:147-167. 1975.

FERNANDO, W. G. D., WATSON, A. K. & PAULITZ, T. C. **Phylloplane *Pseudomonas* spp enhance disease caused by *Colletotrichum coccodes* on velvetleaf.** Biological Control, 4: 125 - 131, 1994.

GARCIA, F. A. O.; ROMEIRO, R. S.; VIEIRA JÚNIOR, J. R. & BONON, K. **Um isolado de *Bacillus cereus* (UFV-172) residente de filoplano inibindo a germinação de esporos de *Phaeoisariopsis griseola* em folíolos de feijoeiro.** Summa Phytopathologica, 32: S62, 2006 [Abstract]

GUETSKY, R.; SHTIENBERG, D.; ELAD, Y.; FISCHER, E.; DINOOR, A. **Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease supression.** Phytopathology. v. 92, n. 9, p. 976-985, 2002.

HALFELD-VIEIRA, B. A. **Bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de controle biológico de enfermidades da parte aérea da cultura.** Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. Tese (Doutorado), 98p., 2002.

HALFELD-VIEIRA, B. A., ROMEIRO, R. S. & CARRER FILHO, R. **Atividade antagonística *in vitro* de residentes do filoplano de tomateiro contra fitopatógenos fúngicos e bacterianos da cultura.** Fitopatologia Brasileira, 25: 347, 2000.

HALFELD-VIEIRA, B. A.; ROMEIRO, R.S. & MIZUBUTI, E. S. G. **Métodos de isolamento de bactérias do filoplano de tomateiro visando populações específicas e implicações como agentes de biocontrole.** Fitopatologia Brasileira, v.29, n. 6, p.638-643, 2004.

HETHERINGTON, S. D., CHAKRABORTY, S., THOMAS, M. & IRWIN, J. A. G. **The relationship between anthracnose severity and populations of bacteria on the phylloplane of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra***. *Biological Control*, 5:39 - 46, 1995.

JIMÉNEZ, J. M., GALINDO, J. J., RAMÍREZ, C. & ENRÍQUEZ, G. A. **Evaluacion Del combate biologico y quimico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao en Costa Rica**. *Cocoa producers' Alliance*, 553 - 456, 1988

JOCK, S.; VÖLKSCH, B.; MANSVELT, L.; GEIDER, K. **Characterization of *Bacillus* strains from apple and pear trees in South Africa antagonistic to *Erwinia amylovora***. *FEMS Microbiology Letters*. v. 211, n. 2, p. 247-252, 2002.

KADO, C. I. & HESKETT, M. G. **Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas***. *Phytopathology*, 60: 969-979, 1970

KATOH, M.; HIROSE, I.; KUBO, Y.; HIKICHI, Y.; KUNOH, H.; FURASAWA, I.; SHISHIYAMA, J. **Use of mutants to indicate factors prerequisite for penetration of *Colletotrichum lagenarium* by appressoria**. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 32: 177-184. 1988.

KEMPF, H.J.; BAUER, P.H.; SCHROTH, M.N. **Herbicolin A associated with crown and roots of wheat after seed treatment with *Erwinia herbicola* B247**. *Phytopathology*. v. 83, n. 2, p. 213-216, 1993.

KINKEL, L. L., WILSON, M. & LINDOW, S. E. **Utility of microcosm studies for predicting phylloplane bacterium population sizes in the field**. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3413-3423, 1996.

KINKLE, L. L. **Microbial population dynamics in leaves**. *Annual Review of Phytopathology*, 35: 327-347, 1997.

KÖHL, J. & FOKKEMA, N. J. **Strategies for biological control of necrotrophic fungal foliar pathogens**. In: BOLAND, G. J. & KUYKENDALL, L. D. (Eds). *Plant-Microbe*

Interactions and Biological control. New York Basel Hong Kong: Marcel Dekker, Inc., 1998. p49 – 88

KONG, G. A., K., K. J. & BROWN, J. F. **Phylloplane bacteria antagonistic to the sunflower pathogen *Alternaria helianthi***. Australasian plant Pathology, 26: 85 - 97, 1997.

KORSTEN, L., DE JAGER, E. S., DE VILLIERS, E. E., KOTZÉ, J. M. & WEHNER, F. C. **Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruit surfaces for biocontrol of avocado postharvest diseases**. Plant disease, 79: 1149 - 1156, 1995.

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

LAST, F. T. & DEIGHTON, F. C. **The non-parasitic microflora on the surfaces of living leaves**. Transactions of the British Mycological Society, 48: 83 - 99, 1965.

LAST, F. T. **Seasonal incidence of *Sporobolomyces* on cereal leaves**. Transactions of the British Mycological Society, 48: 221 - 229, 1955.

LEHNINGER, A. L. **Biochemistry**. 4 ed., Worth Publishers Inc, New York. 1976, 1104p.

LEITE, R. S. V., ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., KARASAWA, M., MAFFIA, L. A. & ARAUJO, J. C. A. **Controle biológico de enfermidades da parte aérea de tomateiro pelo uso de residentes de filoplano pré-selecionados como antagonistas**. Fitopatologia Brasileira, 23: 210, 1998.

LEVY, E. & CARMELI, S. **Biological control of plant pathogens by antibiotic-producing bacteria**. Allelopathy Organisms, Processes and Applications. v. 41, p.136-142, 1995.

LINDOW, S.E. & LEVEAU, J.H.J. **Phyllosphere microbiology**. Current Opinion in Biotechnology 13:238-243. 2002.

LOPEZ, A. M. Q. **Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*** in Revisão Anual de Patologia de Plantas, volume 9: 291-339, 2001. Passo Fundo

LUZ, W. C. **Efeito dos microorganismos do filoplano sobre as manchas fúngicas foliares do trigo.** Fitopatologia Brasileira, 10: 73 - 78, 1985.

MACAGNAN, D. **Seleção de procariotas residentes de filoplano visando o biocontrole da vassoura-de-bruxa do cacauero (*Theobroma cacao* L.) incitada por *Crinipellis pernicioso* (STAHEL) SINGER.**, Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia, 2001. 57p. (Tese de Mestrado).

MASABA, D. & WALLER, J.M. **Coffee berry disease: the current status.** In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds). *Colletotrichum: biology, pathology and control.* England, CAB Internacional Wallingford, p.237-249, 1992.

MICHEREF, S. J., SILVEIRA, N. S. S. & MARIANO, R. L. R. **Antagonismo de bactérias sobre *Colletotrichum graminicola* e potencial de biocontrole da antracnose do sorgo.** Fitopatologia Brasileira, 19: 541 - 545, 1994a

MICHEREF, S. J., SILVEIRA, N. S. S., REIS, A. & MARIANO, R. L. R. **Epiphytic Bacteria Antagonistic to *Curvularia* leaf spot of yam.** Microbial ecology, 28: 101 - 110, 1994b

MIZUBUTI, E. S. G., MAFFIA, L. A., MUCHOVEJ, J. J., ROMEIRO, R. S. & BATISTA, U. G. **Selection of isolates of *Bacillus subtilis* with potential for the control of dry bean rust.** Fitopatologia Brasileira, 20: 540 - 544, 1995.

MONTESINOS, E., BONATERRA, A., OPHIR, Y. & BEER, S. V. **Antagonism of selected bacterial strains to *Stemphylium vesicarium* and biological control of brown spot of pear under controlled environment conditions.** Phytopathology, 86: 856 - 863, 1996.

PABITRA, K., BORA, L. C., BHAGABATI, K. N. & KALITA, P. **Phylloplane microflora of citrus and their role in management of citrus canker**. Indian Phytopathology, 49:234-237, 1996.

ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., CARVALHO, M. G. & CARRER FILHO, R. **Seleção de bactérias residentes de filoplano de tomateiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. Summa Phytopathologica, 26: 220 - 224, 2000a

ROMEIRO, R. S., NEVES, D. M. S., HALFELD-VIEIRA, B. A., MIZUBUTI, E. S. G. & DEUNER, C. C. **Inadequação de apenas um patógeno desafiante na seleção massal de residentes de filoplano para fins de controle biológico - um caso**. Summa Phytopathologica, 26: 142, 2000b

SANDOVAL, G. A. D., ARMBRECHT, H. & GRANADA, A. **Posibilidad de control biológico de la moniliasis del cacao**. Proceedings 10th International Cocoa Research Conference Cocoa producers' Alliance, 473 - 477, 1988.

VALE, F.X.R., FERNANDES FILHO, E.I. & LIBERATO, J.R. **QUANT. A software plant disease severity assessment**. 8<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Christchurch New Zealand, 2003. p.105.

VIEIRA JÚNIOR, J. R. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia. 2005. 96p. (Tese de Doutorado)

WILSON, M.; HIRANO, S.S.; LINDOW, S.E. **Location and survival of leaf-associated bacteria in relation to pathogenicity and potential for growth within the leaf**. Applied and Environmental Microbiology. v. 65, n. 4, p. 1435–1443, 1999.

## 5 CAPÍTULO III - SENSIBILIDADE DE AGENTES BACTERIANOS DE CONTROLE BIOLÓGICO A FUNGICIDAS E INSETICIDAS AGRÍCOLAS UTILIZADOS NA CULTURA DA MACIEIRA

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi estudar a sensibilidade de dezenove bactérias residentes de filoplano de macieira selecionadas com potencial antagônico para Mancha das Folhas da Macieira a compostos fungicidas e inseticidas agrícolas utilizados na cultura da macieira com a finalidade de compatibilizar o uso dos agentes de biocontrole no sistema de Manejo Integrado. Foram avaliados sete ingredientes ativos de fungicidas (tiofanato metílico, clorotalonil, mancozebe, captana, metiram, piraclostrobina e ditianona) e seis de inseticidas (clorpirifós, fenitrotiona, malationa, fosmete, tebufenozida e metidationa) nas concentrações de 100, 10 e 1 mg.L<sup>-1</sup>. Para isso, foram realizadas três avaliações. Duas avaliações verificou-se a sensibilidades das bactérias aos ingredientes ativos e a terceira avaliação, verificou-se a alteração de pH das soluções de fungicidas e inseticidas pelo crescimento das bactérias. Todos os isolados foram compatíveis com os fungicidas tiofanato metílico, clorotalonil, mancozebe, metiram, ditianona, e com os inseticidas fenitrotiona, malationa, tebufenozida e metidationa, nas concentrações avaliadas, porém apresentaram incompatibilidade com os fungicidas piraclostrobina e captana, e os inseticidas clorpirifós, fosmete e metidationa inibiram, aproximadamente, 100 % do crescimento dos isolados antagônicos em comparação com os demais fungicidas e inseticidas. Todos os isolados bacterianos antagônicos a MFM conseguiram alterar, aproximadamente, 30% o pH dos fungicidas e inseticidas utilizados na cultura da macieira. Estes dados apontam para a possibilidade de uso integrado entre técnicas de controle biológico dentro da produção integrada de macieira considerando os produtos atualmente registrados para a cultura, sendo necessárias futuras pesquisas em campo com o uso dos isolados bacterianos em mistura ou em alternância com fungicidas e inseticidas.

**Palavras-chaves:** procariotas, *Malus domestica*, clorotalonil, mancozebe, malationa

## **SENSITIVITY OF BIOLOGICAL BACTERIAL AGENTS OF CONTROL THE USED FUNGICIDES AND AGRICULTURAL INSECTICIDES IN THE CULTURE OF THE APPLE TREE**

### **ABSTRACT**

The objective of this work was to study the sensitivity of nineteen resident bacteria of phylloplane of apple tree selected with antagonistic potential for Spot of leaves of the Apple tree fungicidal composites and insecticidal agriculturists used in the culture of the apple tree with the purpose to make compatible the use of the agents of biocontrol in the system of Integrated Handling. Seven active ingredients of fungicides (methylic, clorotalonil tiofanato, mancozebe, captana, metiram, piraclostrobina and ditianona) and six of insecticides (clorpirifós, fenitrotiona, malationa, fosmete, tebufenozida and metidationa) in the concentrations of 100, 10 and 1 had been evaluated mg. L<sup>-1</sup>. For this, three evaluations had been carried through. Two evaluations it was verified sensibilidades of the bacteria to the active ingredients and the third evaluation, verified it alteration of pH of the solutions of fungicides and insecticides for the growth of the bacteria. All the isolated ones had been compatible with the fungicides methylic, clorotalonil tiofanato, mancozebe, metiram, ditianona, and with the insecticides fenitrotiona, malationa, tebufenozida and metidationa, in the evaluated concentrations, however they had presented incompatibility with the piraclostrobina and captana s fungicidal, and the insecticides clorpirifós, fosmete and metidationa had inhibited, approximately, 100% of the growth of isolated the antagonistic ones in comparison with the excessively fungicidal and insecticidal ones. All isolated bacterial antagonistic the MFM had obtained to modify, approximately, 30% pH of the fungicides and insecticides used in the culture of the apple tree. These data point inside with respect to the possibility of use integrated between techniques of biological control of the integrated production of apple tree considering the products currently registered for the culture, being necessary future research in field with the use of isolated bacterial in mixture or alternation with fungicides and the insecticides.

**Keywords:** prokaryotes, *Malus domestica*, clorotalonil, mancozebe, malationa

## 5.1 INTRODUÇÃO

A compatibilidade entre agentes de controle biológico e produtos antimicrobianos traz várias aplicações práticas, desde a elaboração de meios semi-seletivos para estudos de ecologia e monitoramento de populações e a elaboração de estratégias de controle (KLOEPPER e BEAUCHAMP, 1992; STOCKWELL et al., 1998; BEATTIE & MARCELL, 2002).

Da mesma forma, a capacidade de combinar antagonistas e fungicidas pode ser um dos meios de otimizar o seu uso, aumentando a eficiência e permitindo a inserção do controle biológico em um sistema de manejo integrado de doenças (TRONSMO e YSTAAS, 1980, KORSTEN et al., 1997). MINUTO et al. (1995) demonstraram que a mistura de espécies de *Fusarium* antagonistas a um fungicida do grupo dos benzimidazoles aumentou a eficiência de ambos no controle da murcha causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cyclaminis*. DUFFY (2000) verificou que no controle da podridão de raízes, causada por *Rhizoctonia* spp., a aplicação combinada do fungicida pencycuron e a rizobactéria *Pseudomonas fluorescens*, em tratamento de sementes de trigo, foi mais eficiente que os tratamentos aplicados separadamente. Um fator importante observado foi que o fungicida não inibiu o crescimento da bactéria *in vitro*, não comprometendo a colonização de raízes, o que permitiu o estabelecimento do agente de biocontrole.

Utilizando diversas estratégias de aplicações entre fungicidas e *Trichoderma harzianum*, no controle do mofo-cinzento causado por *Botrytis cinerea* em tomateiro, ELAD et al. (1995) verificaram que aplicações alternadas foram mais eficientes no controle da doença do que aplicações sucessivas de um único tratamento. SHTIENBERG e ELAD (1997) também utilizaram um sistema de alternância de aplicação de *T. harzianum* e fungicidas, no controle do mofo-cinzento, baseando-se em condições de ambiente para tomada de decisão de qual tratamento deveria ser aplicado em cada momento. KORSTEN et al. (1997), observaram que aplicações alternadas de *Bacillus subtilis* e fungicidas, em pré-colheita, foram capazes de reduzir

significativamente a severidade da mancha de *Pseudocercospora purpurea* em abacateiro.

Estas estratégias, além de otimizarem a eficiência dos tratamentos, são um modo de prevenir a seleção de populações de patógenos resistentes a fungicidas, o que reduz a eficiência do controle químico ao longo do tempo (PAULITZ e BÉLANGER, 2001).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a sensibilidade de 19 agentes bacterianos, selecionados do filoplano de macieira, testados para o biocontrole dos patógenos *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Glomerella cingulata* causadores da mancha das folhas a ingredientes ativos de fungicidas e inseticidas, visando adequar os antagonistas ao sistema de manejo integrado.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas de uso agrícola

A sensibilidade dos antagonistas aos diversos produtos foi estudada por dois métodos. No primeiro caso, foram preparadas culturas de cada antagonista em meio 523 (KADO e HESKETT, 1970) líquido crescidos 24 h, adicionando-se 300  $\mu\text{L}$  da cultura a 30 mL do meio semi-sólido fundente. A mistura foi vertida em placa de Petri de 9 cm de diâmetro e, após solidificado, depositados na superfície do meio, cinco discos de papel filtro por placa contendo substâncias distintas nas concentrações estudadas. As placas foram mantidas em incubadora a 25 °C por até 48 h, quando avaliou-se a presença ou não dos halos de inibição (ROMEIRO, 2001). A medição dos halos foi realizada com uma régua, a partir da periferia do disco até o bordo do halo.

Foram testados os seguintes produtos em concentrações do ingrediente ativo, pré-determinadas no meio: fungicidas, tiofanato metílico (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); clorotalonil (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); mancozebe (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); captana (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); metiram (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); piraclostrobina (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); ditianona (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); inseticidas, clorpirifós (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); fenitrotiona (100, 10, 1  $\text{mg.L}^{-1}$ ); malationa

(100, 10, 1 mg.L<sup>-1</sup>); fosmete (100, 10, 1 mg.L<sup>-1</sup>); tebufenozida (100, 10, 1 mg.L<sup>-1</sup>); metidationa (100, 10, 1 mg.L<sup>-1</sup>);

No segundo método, as culturas de cada antagonista foram desenvolvidas em 5 mL de meio 523 líquido em tubos de ensaio, por 24 h a 25 °C. Soluções concentradas das formulações comerciais de cada produto foram preparadas, no momento do uso, em Erlenmeyer contendo água estéril. Obtiveram-se diluições sucessivas em tubos de ensaio, de maneira que, ao ser pipetado 1 mL de cada solução e adicioná-lo a 14 mL de meio 523 semi-sólido fundente, se obtivesse a concentração desejada do ingrediente ativo no meio de cultura (EMERY et al. 2002).

Os meios foram vertidos em placas de Petri e, após solidificar, 2 µL da cultura de cada antagonistas foram depositados, próximo ao bordo da placa, em pontos equidistantes, fazendo-se três repetições em placas distintas. Para atestar a viabilidade das culturas, cada isolado foi semeado em meio sem adição de nenhuma substância (testemunha) e as avaliações realizadas 24, 48 e 72 horas após o semeio.

As observações de crescimento bacteriano abundante nos locais onde as culturas foram adicionadas indicaram a compatibilidade do antagonista com o produto na concentração em teste. Enquanto que, o crescimento de poucas colônias e / ou nenhum crescimento demonstraram haver interferência do ingrediente ativo classificando-se como incompatibilidade.

### **5.2.2 Capacidade de alterar pH**

Foram utilizados frascos Erlenmeyer com capacidade de 250 mL, aos quais foram inoculados 0,5 mL ( $7 \times 10^6$  UFC/mL) do pré-cultivo em 50 mL de água estéril acrescida dos fungicidas nas concentrações estudadas. Os frascos foram incubados em agitador horizontal ( $30 \pm 2$  °C, 150 rpm, 24h). Previamente, à incubação dos antagonistas + ingredientes ativos em agitador horizontal, e ao final do período de 24h, mediu-se o pH da mistura de cada frasco para verificação de uma possível mudança de pH, indicando, possível, caso de metabolização.

### 5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados sobre a sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas (TABELA 17 e 18) demonstraram que estes foram insensíveis a dois princípios ativos de fungicidas e a três princípios ativos de inseticida, provavelmente por terem sido obtidos de plantas não expostas aos produtos, nos ambientes de cultivos comerciais. Analisando ao ponto de seleção *in vitro* de antagonistas, se alguns produtos testados fossem adicionados ao meio de cultura para o isolamento dos antagonistas estes não teriam sido obtidos, uma vez que foram sensíveis aos cinco compostos.

Nas concentrações testadas de cada substância, a maioria dos isolados antagônicos foram insensíveis aos fungicidas: tiofanato metílico, mancozebe, ditianona, metiram e clorotalonil, e aos inseticidas: fenitrotiona, malationa, tebufenozida e metidationa. Porém mostraram-se sensíveis a piraclostrobina, captana, clorpirifós e a fosmete. Os dois princípios ativos de fungicidas (piraclostrobina, captana), os isolados foram sensíveis para todas as concentrações, enquanto que nos princípios ativos dos dois inseticidas (clorpirifós e a fosmete) foram sensíveis nas concentrações 100 e 10 mg.L<sup>-1</sup> (TABELA 17 e 18).

Algumas substâncias podem ser utilizadas sozinhas ou em combinação, como agentes seletivos em meio de cultura, visando o reisolamento dos antagonistas para estudos de dinâmica populacional (STOCKWELL et al., 1998; ZHANG e YUEN, 1999; RAMOS et al., 2000), principalmente pela seleção de mutantes espontâneos resistentes a altas concentrações dos produtos (ROMEIRO, 2001).

Os resultados demonstraram que o uso de fungicidas inorgânicos e sua associação aos isolados, podem ser possíveis, visto que todos os isolados apresentaram insensibilidade a maioria dos fungicidas (TABELA 17 e 18). Porém, Vieira Junior (2005) relatou que o fungicida Manzate, o qual tem o mancozebe como princípio ativo, têm na sua composição básica os elementos manganês e zinco. Produtos a base de sais inorgânicos tem sido relatados como bacteriostáticos e bactericidas contra fitobacterioses, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (OSHIMA e DICKENS, 1971; YUNIS et al., 1980; ROMEIRO, 2000).

SILVA et al.,(2006) estudaram o efeito de técnicas para avaliação *in vitro* de fungicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*,e constataram que a bactéria metabolizava os fungicidas em teste através da mudança do pH. Algo semelhante foi verificado neste trabalho, onde todos os isolados antagônicos conseguiram alterar o pH dos fungicidas e inseticidas indicando uma possível metabolização (TABELA 19). A diferença entre os dois trabalhos foi verificada quanto ao valor da faixa de pH. Enquanto SILVA et al.,(2006), verificaram que o pH aumentava como uso da bactéria, nesse trabalho verificou-se a diminuição do pH pelos isolados antagônicos em relação à testemunha. Assim, pode-se inferir que os fungicidas e os inseticidas, seja o ingrediente ativo ou algum componente da formulação, podem ser utilizados como nutrientes pelos isolados antagônicos, corroborando com SUTTER et al. (1971) e SILVA et al. (2006) que observaram resultados semelhantes com os inseticidas diazinona e malationa.

Ainda, SILVA et al., (2006), com referência à compatibilidade entre a célula e os fungicidas, declararam que a avaliação em meio líquido é a mais confiável, pois possibilita a dispersão dos metabólitos secundários, garante constante oxigenação, e total distribuição do produto no meio de cultura. Isto associado ao constante contato do patógeno com o substrato aumenta a possibilidade de metabolização dos componentes do meio e conseqüente crescimento populacional.

Entretanto, os resultados se mostraram promissores quanto ao uso dos isolados com alguns fungicidas sistêmicos e outros protetores. Esta compatibilidade permite que os antagonistas se insiram num sistema de manejo integrado (VAN LENTEREN, 2000; KONDOH et al., 2001) permitindo a alternância de aplicação (ELAD et al., 1995; KORSTEN et al., 1997) ou a combinação dos antagonistas com fungicidas (MINUTO et al., 1995; DUFFY, 2000), proporcionando ao controle biológico a participação como um dos componentes de controle de doenças, podendo-se também aliá-lo a sistemas de previsão em que produtos químicos seriam utilizados somente em casos extremos, de grande favorecimento dos patógenos, e os agentes de biocontrole aplicados em situações de menor risco, aumentando a gama de mecanismos envolvidos no controle dos patógenos, reduzindo-se os riscos de ocorrerem raças resistentes pela redução da pressão de seleção sobre os patógenos (SHTIENBERG e ELAD, 1997).

#### 5.4 CONCLUSÕES

- Os dezenoves isolados antagônicos foram capazes de crescer em todas as concentrações dos fungicidas tiofanato metílico, clorotalonil, metiram, ditianona e mancozebe e dos inseticidas fenitrotona, malationa e tebufenozida.
- Os fungicidas piraclostrobina e captana, e os inseticidas clorpirifós, fosmete e metidationa inibiram , aproximadamente 100 % do crescimento dos isolados antagônicos em comparação com os demais fungicidas e inseticidas.
- Todos os isolados bacterianos antagônicos a MFM conseguiram alterar, aproximadamente, 30% o pH dos fungicidas e inseticidas utilizados na cultura da macieira.

#### 5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEATTIE, G.A.; MARCELL, L.M. **Comparative dynamics of adherent and nonadherent bacterial populations on maize leaves.** Phytopathology. v. 92, n. 9, 2002.

DUFFY, B. **Combination of pencycuron and *Pseudomonas fluorescens* strain 2-79 for integrated control of rhizoctonia root rot and take-all of spring wheat.** Crop Protection. v. 19, n. 1, p. 21-25, 2000.

ELAD, Y.; GULLINO, M.L.; SHTIENBERG, D.; ALOI, C. **Managing *Botrytis cinerea* on tomatoes greenhouses in the mediterranean.** Crop Protection. v. 14, n. 2, p. 105-109, 1995.

EMERY, K.M.; SCHERM, H.; SAVELLE, A.T. **Assessment of interactions between components of fungicide mixtures against *Monilinia fructicola*.** Crop Protection. v. 21, n. 1, p. 41-47, 2002.

KADO, C.I.; HESKETT, M.G. **Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*.** *Phytopathology*. v. 60, n. 6, p. 969-976, 1970.

KIMATI, H.; GIMENES-FERNANDES, N.; SOAVE, J.; KUROZAWA, C.; BRIGNANI NETO, F.; BETTIOL, W. **Guia de Fungicidas Agrícolas.** 2 ed. v. 1, Jaboticabal: Grupo Paulista de Fitopatologia. 1997. 225 p.

KLOEPPER, J.W.; BEAUCHAMP, C.J. **A review of issues related to measuring colonization of plant roots by bacteria.** *Canadian Journal of Microbiology*. v. 38, p. 1219-1232, 1992.

KONDOH, M.; HIRAI, M.; SHODA, M. **Intergated biological and chemical control of damping-off caused by *Rhizoctonia solani* using *Bacillus subtilis* RB14-C and flutolanil.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*. v. 91, n. 2, p. 173-177, 2001.

KORSTEN, L.; DE VILLIERS, E.E.; WEHNER, F.C.; J.M. KOTZÉ. **Field Sprays of *Bacillus subtilis* and Fungicides for Control of Preharvest Fruit Diseases of Avocado in South Africa.** *Plant Disease*. v. 81, n. 5, p. 455-459, 1997.

LIU, C.H.; WU, W.S. **Chemical na biological control of tomato early blight.** *Plant Pathology Bulletin*. v. 6, p. 132-140, 1997.

MICHAUD, M.; MARTINEZ, C.; SIMAO-BEAUNOIR, A.M.; BÉLANGER, R.R.; TWEDDELL, R.J. **Selection of antagonist microorganisms against *Helminthosporium solani*, causal agent of potato silver scurf.** *Plant Disease*. v. 86, n. 7, p. 717-720, 2002.

MINUTO, A.; MIGHELI, Q.; GARIBALDI, A. **Evaluation of antagonistic strains of *Fusarium* spp. in the biological control and integrated control of *Fusarium* wilt of cyclamen.** *Crop Protection*. v. 14, n. 3, p. 221-226, 1995.

OSHIMA, N. & DICKENS, L. E. **Effects of copper sprays on secondary spread of common bacterial blight of beans.** *Plant Disease Reporter*, v.55, n.7, p.609-610, 1971.

PAULITZ, T.C.; BÉLANGER, R.R. **Biological control in greenhouse systems** Annual Review of Phytopathology. v. 39, p. 103–33, 2001.

ROMEIRO, R. S.; **Bactérias fitopatogênicas**, Viçosa, Imprensa. Universitária, 2000, 283p.

ROMEIRO, R.S. **Métodos em Bacteriologia de Plantas**. Viçosa:UFV, 2001. 279 p.

SHTIENBERG, D.; ELAD, Y. **Incorporation of weather forecasting in integrated, biological-chemical management of *Botrytis cinerea***. Phytopathology. v. 87, n. 3, p. 332-340, 1997.

SILVA, E.R.L.; ALVES, L.F.A.; SENE, L. ; SANTOS, J.; BONINI, A.K.; POTRICH, M. ; NEVES, P.M.O.J. **Técnicas para avaliação “in vitro” de fungicidas sobre *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki***. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 73(4): 429-437,2006.

STOCKWELL, V.O.; JOHNSON, K.B.; LOPER, J.E. **Establishment of bacterial antagonists of *Erwinia amylovora* on pear and apple blossoms as influenced by inoculum preparation**. Phytopathology. v. 88, n. 6, p. 506-513, 1998.

SUTTER, G.R.; ABRAHANSON, M.D.; HAMILTON, E.W.; VICK, I.D. **Compatibility of *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* and Chemical inseticides. 1. Effect of Insecticide Doses on Bacterial Replication Rate**. *Journal of Economic Entomology*, v.64, n.6, p.1348-1350, 1971.

TRONSMO, A., AND YSTAAS, J. 1980. **Biological control of *Botrytis cinerea* on apple**. Plant Disease, v. 64, n. 11, p.1009, 1980.

VAN LENTEREN, J.C. **A greenhouse without pesticides: fact or fantasy?** Crop Protection. v. 19, n. 6, p. 375-384, 2000.

VIEIRA JÚNIOR, J. R. **Procariotas residentes de filoplano do feijoeiro como agentes de biocontrole de enfermidades da parte aérea da cultura**. Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Fitopatologia. 2005. 96p. (Tese de Doutorado)

YUNIS, H.; BASHAN, Y.; OKON, Y. & HENIS, Y. **Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato***. Plant Disease, v.65, n.10, p.937-939, 1980

ZHANG, Z.; YUEN, G.Y. **The role of chitinase production by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3 in biological control of *Bipolaris sorokiniana***. Phytopathology. v. 90, n. 9, p. 384-389, 2000.

TABELA 16 - Sensibilidade de 19 antagonistas (bactérias residentes de filoplano) a 7 fungicidas e 6 inseticidas, registrados para cultura da macieira. Curitiba, PR, 2007.

Produto Comercial	Segmento de raio dos halos de inibição para cada isolado (cm)																		
	A02	A06	A07	A19	A23	A24	A28	A68	A69	A103	A131	A132	A133	A134	A135	A137	A138	A141	A142
<b>Fungicidas</b>																			
Piraclostrobina (100 mg.L-1)	1,4	1,1	1	1,3	1	1,1	1,1	1	0,9	0,9	1	1,1	0,9	1,2	1,1	1,1	0,9	0,9	0,9
Piraclostrobina (10 mg.L-1)	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,4	0,6	0,6	0,4	0,3	0,5	0,4	0,6	0,5	0,5	0,6	0,4	0,5	0,5
Piraclostrobina (1 mg.L-1)	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
Captana (100 mg.L-1)	0,9	0,8	0,7	0,9	0,8	0,7	0,8	0,7	0,9	0,7	0,8	0,7	0,9	0,9	0,8	0,7	0,7	0,7	0,6
Captana (10 mg.L-1)	0,3	0,4	0,2	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3
<b>Inseticidas</b>																			
Clorpirifós (100 mg.L-1)	0,6	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,7	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,5
Clorpirifós (10 mg.L-1)	0,3	0,2	0,1	0,3	0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
Fosmete (100 mg.L-1)	0	0,5	0	0	0	0	0	0,3	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fosmete (10 mg.L-1)	0	0,2	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Metidationa (100 mg.L-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0	0	0	0	0,3	0	0	0
Metidationa (10 mg.L-1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0	0	0	0	0,1	0	0	0

\* Os tratamentos com os fungicidas (Tiofanato metílico, clorotalonil, metiram, ditianona e mancozebe e inseticidas (Fenitrotiona, Malationa e Tebufenozida) não houve formação de halos representativos de inibição pelos produtos.

TABELA 17 - Crescimento dos antagonistas quando expostos a diferentes concentrações dos principais fungicidas e inseticidas agrícolas utilizados em macieira. Curitiba, PR, 2007.

Produto Comercial	NHFC (h)*	Número de colônias	
		col< test	col=test
<b>Fungicidas</b>			
Piraclostrobina (100 mg.L <sup>-1</sup> )	-	-	-
Piraclostrobina (10 mg.L <sup>-1</sup> )	<b>72</b>	19	0
Piraclostrobina (1 mg.L <sup>-1</sup> )	<b>48</b>	19	0
Captana (100 mg.L <sup>-1</sup> )	<b>48</b>	19	0
Captana (10 mg.L <sup>-1</sup> )	<b>24</b>	19	0
<b>Inseticidas</b>			
Clorpirifós (100 mg.L <sup>-1</sup> )	<b>48</b>	19	0
Clorpirifós (10 mg.L <sup>-1</sup> )	24	19	0
Fosmete (100 mg.L <sup>-1</sup> )	24	2	17
Fosmete (10 mg.L <sup>-1</sup> )	24	2	17
Metidationa (100 mg.L <sup>-1</sup> )	24	2	17

\* NHFC – número de horas para formação de colônias

\*\* Nos tratamentos com os fungicidas (Tiofanato metílico, clorotalonil, metiram, ditianona e mancozeb) e inseticidas (Fenitrotiona, Malationa e Tebufenozida) foram onde os isolados antagonistas cresceram igual a testemunha (24h), sem efeito dos produtos no crescimento.

\*\*\* col<test – número de isolados antagônicos onde o tamanho da colônia era menor em relação da testemunha. Col=tes – número de isolados antagônicos onde o tamanho da colônia era do mesmo tamanho da colônia testemunha.

TABELA 18 - Capacidade de metabolização dos antagonistas quando expostos a diferentes concentrações dos principais 7 fungicidas e 6 inseticidas agrícolas utilizados em macieira. Curitiba, PR, 2007.

Produtos	pH do produto			Faixa de pH alterada		
	100	10	1	100	10	1
<b>Fungicidas</b>						
Metiram	7,1	6,8	6,5	5,7	4,8	6,6
Tiofanato metílico	8,6	8,0	7,0	5,3	4,7	6,6
Clorotalonil	8,3	7,9	7,0	5,6	5,2	6,4
Piraclostrobina (100 mg.L-1)	6,6	6,0	6,8	5,8	5,2	6,6
Captana (100 mg.L-1)	8,6	8,1	7,0	5,7	5,2	6,7
Ditianona (100 mg.L-1)	7,7	7,0	7,0	5,3	4,6	6,6
Mancozebe (100 mg.L-1)	7,1	7,0	7,0	5,4	5,3	6,6
<b>Inseticidas</b>						
Clorpirifós (100 mg.L-1)	5,9	6,3	7,0	4,8	6,0	6,3
Fenitrotiona (100 mg.L-1)	6,3	6,5	7,0	5,6	6,2	6,4
Malationa (100 mg.L-1)	6,8	7,0	7,1	6,0	6,5	6,5
Fosmete (100 mg.L-1)	5,8	6,6	7,1	5,0	5,8	6,3
Tebufenozida (100 mg.L-1)	6,8	7,0	7,1	6,2	6,6	6,7
Metidationa (100 mg.L-1)	6,4	6,7	7,0	6,7	6,2	6,8

\* todas as bacterias reduziram o pH

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o desenvolvimento deste trabalho algumas considerações são cabíveis em relação aos resultados obtidos no controle da mancha das folhas causada por *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, e *Glomerella cingulata* na cultura da macieira.

Um fato importante que merece ser destacado é o de que o controle biológico tem eficiência diferenciada no controle do patógeno dependendo do modo de ação, a pressão da doença e as condições climáticas existentes. Neste sentido, cabe estudar a evolução da epidemia em cada fase da cultura, bem como o comportamento climático, a fim de que o controle biológico pelo uso de bactérias residentes de filoplano seja efetivo.

Os resultados obtidos com o efeito da temperatura mostraram sua influência, principalmente na germinação e produção de conídios. Assim, é possível, estudar a epidemiologia da doença no estado do Paraná, adotando modelos de previsões eficientes da doença.

Os resultados obtidos com o efeito do pH demonstraram que os fungos são favorecidos por uma faixa de pH de 6,5 – 7,5. Com isso, estudos de fisiologia de fungos tendem a rever seus resultados e melhorar o entendimento do controle de fungos pelo uso de produtos químicos que alterem o pH.

É preciso fazer um levantamento nas áreas de cultivo de macieira para se saber qual a predominância da espécie de *Colletotrichum*. Com essa informação, há possibilidade de sucesso do controle da mancha das folhas pelo manejo integrado com a utilização de controle químico e biológico.

As folhas se mostraram eficientes na obtenção de isolados bacterianos com potencialidade antogônica à mancha das folhas. Esses isolados possuem o mecanismo de antibiose, comumente encontrado em bactérias, embora nem sempre possa ser correlacionado com o controle obtido *in vivo*. Os ensaios demonstraram que os sete isolados bacterianos foram capazes de suprimir *in vitro* a germinação de conídios, o

crescimento micelial pelo pareamento de cultura, produção de compostos voláteis e termoestáveis, além de inibir a formação de manchas em folhas destacadas.

. Os isolados mostraram-se compatíveis com a maioria dos produtos comerciais testados, o que favorece a introdução destes agentes no manejo integrado da doença.

Novas pesquisas envolvendo diferentes cultivares, fases de aplicação e dosagens dos produtos a base de microrganismo são necessárias, inclusive com a intensificação de estudos bioquímicos para cada fase da cultura a fim de se efetivar uma estratégia eficiente de controle da mancha das folhas que atenda as necessidades dos produtores de maçã.

**ANEXO**

TABELA 19 - Relação de isolados de antagonistas pré-selecionados para o biocontrole da mancha das folhas de macieira, a partir da porcentagem de inibição de germinação de conídios e inibição de crescimento micelial em relação a *Colletotrichum gloeosporioides* (CG) E *C. acutatum* (CA) E *Glomerella cingulata* (GC). Curitiba, PR, 2007.

Isolado	Inibição de Germinação de Conídios (%)		Área do Crescimento Micelial (mm <sup>2</sup> )			Índice
	CA	CG	CA*	CG*	GC*	
A01	3	2	-90,0	-90,0	-90,0	-265
<b>A02</b>	<b>100</b>	<b>98</b>	<b>53,7</b>	<b>55,78</b>	<b>60,09</b>	<b>367</b>
A03	6	2	-90,0	-90,0	-90,0	-262
A04	99	98	54,2	56,12	-90,0	218
A05	2	1	-90,0	-90,0	-90,0	-267
<b>A06</b>	<b>92</b>	<b>100</b>	<b>54,6</b>	<b>54,87</b>	<b>54,96</b>	<b>356</b>
<b>A07</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>56,7</b>	<b>58,32</b>	<b>52,19</b>	<b>367</b>
A08	3	1	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A09	100	100	60,1	-90,0	-90,0	80
A10	99	99	-90,0	54,36	55,39	217
A11	7	1	-90,0	-90,0	-90,0	-263
A12	0	0	-90,0	-90,0	-90,0	-270
A13	1	4	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A14	5	0	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A15	2	1	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A16	97	100	51,0	-90,0	-90,0	68
A17	4	5	-90,0	-90,0	-90,0	-261
<b>A18</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>53,7</b>	<b>56,03</b>	<b>58,85</b>	<b>369</b>
A19	2	6	-90,0	-90,0	-90,0	-262
A20	80	100	58,2	-90,0	-90,0	58
A21	2	5	-90,0	-90,0	-90,0	-263
<b>A22</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>50,1</b>	<b>55,81</b>	<b>50,36</b>	<b>356</b>
<b>A23</b>	<b>93</b>	<b>88</b>	<b>55,4</b>	<b>56,08</b>	<b>51,03</b>	<b>343</b>
A24	2	6	-90,0	-90,0	-90,0	-262
A25	3	3	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A26	93	75	-90,0	-90,0	-90,0	-102
<b>A27</b>	<b>88</b>	<b>90</b>	<b>54,4</b>	<b>52,31</b>	<b>56,43</b>	<b>341</b>
A28	94	73	53,9	-90,0	-90,0	41
A29	4	0	55,8	53,68	53,96	168
A30	2	2	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A31	4	6	-90,0	-90,0	-90,0	-261
A32	10	7	-90,0	57,44	58,02	42
A33	71	59	-90,0	-90,0	-90,0	-140

A34	6	8	-90,0	-90,0	-90,0	-257
A35	0	3	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A36	3	5	-90,0	-90,0	-90,0	-262
A37	1	0	-90,0	-90,0	-90,0	-268
A38	5	6	-90,0	-90,0	-90,0	-259
A39	1	0	-90,0	-90,0	-90,0	-269
A40	1	3	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A41	3	2	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A42	1	3	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A43	3	0	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A44	3	4	-90,0	-90,0	-90,0	-263
A45	2	5	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A46	3	1	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A47	2	9	-90,0	-90,0	-90,0	-259
A48	2	2	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A49	1	5	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A50	3	7	-90,0	-90,0	-90,0	-261
A51	89	67	52,1	-90,0	-90,0	28
A52	96	99	-90,0	-90,0	-90,0	-75
A53	1	3	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A54	2	4	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A55	3	2	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A56	4	6	-90,0	-90,0	-90,0	-260
A57	8	6	-90,0	-90,0	-90,0	-256
A58	3	0	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A59	3	4	-90,0	-90,0	-90,0	-263
A60	4	2	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A61	3	7	-90,0	-90,0	-90,0	-260
A62	7	1	-90,0	-90,0	-90,0	-262
A63	2	0	-90,0	-90,0	-90,0	-268
A64	9	1	-90,0	-90,0	-90,0	-260
A65	0	0	-90,0	-90,0	-90,0	-270
A66	6	2	-90,0	-90,0	-90,0	-262
<b>A67</b>	<b>100</b>	<b>98</b>	<b>49,4</b>	<b>90,0</b>	<b>57,14</b>	<b>395</b>
<b>A68</b>	<b>97</b>	<b>94</b>	<b>49,9</b>	<b>52,41</b>	<b>59,63</b>	<b>353</b>
A69	97	97	50,0	-90,0	-90,0	64
A70	30	24	-90,0	-90,0	-90,0	-216
A71	12	28	-90,0	-90,0	-90,0	-230
A72	32	18	-90,0	-90,0	-90,0	-220
A73	16	10	-90,0	-90,0	-90,0	-244
A74	21	42	-90,0	-90,0	-90,0	-207
A75	7	1	-90,0	-90,0	-90,0	-262
A76	10	23	-90,0	-90,0	-90,0	-237
A77	2	1	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A78	85	93	-90,0	-90,0	-90,0	-92
A79	16	18	-90,0	-90,0	-90,0	-236

A80	21	18	-90,0	-90,0	-90,0	-231
A81	100	100	52,0	-90,0	63,58	226
A82	94	43	53,1	-90,0	-90,0	10
A83	4	5	-90,0	-90,0	-90,0	-261
A84	14	8	-90,0	-90,0	-90,0	-248
A85	9	5	-90,0	-90,0	-90,0	-256
A86	2	10	-90,0	-90,0	-90,0	-258
A87	11	11	-90,0	-90,0	-90,0	-248
A88	4	8	-90,0	-90,0	-90,0	-258
A89	94	100	64,3	-90,0	-90,0	78
A90	94	100	68,4	-90,0	-90,0	82
A91	16	23	90,0	-90,0	-90,0	-51
A92	19	15	90,0	-90,0	-90,0	-56
A93	90	59	60,2	-90,0	-90,0	29
A94	99	100	59,0	-90,0	-90,0	78
A95	9	10	90,0	-90,0	-90,0	-71
A96	100	85	57,4	-90,0	-90,0	62
A97	99	91	57,8	-90,0	-90,0	68
A98	98	100	57,0	-90,0	-90,0	75
A99	18	9	-90,0	-90,0	-90,0	-243
<b>A100</b>	<b>100</b>	<b>97</b>	<b>58,7</b>	<b>55,28</b>	<b>52,31</b>	<b>363</b>
A101	2	2	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A102	100	99	58,0	-90,0	-90,0	77
A103	20	24	-90,0	-90,0	-90,0	-226
A104	2	3	-90,0	-90,0	-90,0	-265
A105	0	2	-90,0	-90,0	-90,0	-268
A106	2	4	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A107	0	2	55,8	-90,0	-90,0	-122
A108	0	4	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A109	6	10	-90,0	-90,0	-90,0	-254
A110	11	7	-90,0	-90,0	-90,0	-252
A111	1	5	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A112	3	10	-90,0	-90,0	-90,0	-257
A113	12	17	-90,0	-90,0	-90,0	-241
A114	12	8	-90,0	-90,0	-90,0	-250
A115	1	1	-90,0	-90,0	-90,0	-268
A116	1	2	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A117	1	0	-90,0	-90,0	-90,0	-269
A118	2	4	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A119	6	0	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A120	1	3	-90,0	-90,0	-90,0	-266
A121	2	4	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A122	0	1	-90,0	-90,0	-90,0	-268
A123	0	3	-90,0	-90,0	-90,0	-267
A124	3	2	-90,0	-90,0	-90,0	-264
A125	1	1	-90,0	-90,0	-90,0	-268

A126	100	100	44,2	43,28	35,26	<b>323</b>
A127	100	100	40,3	44,66	38,74	<b>324</b>
A128	100	100	41,5	42,97	39,55	<b>324</b>
A129	100	100	39,9	40,36	37,89	<b>318</b>
A130	100	100	40,0	40,75	39,56	<b>320</b>
A131	100	100	-90,0	-90,0	-90,0	-70
A132	100	100	41,0	43,42	40,13	<b>325</b>
A133	100	100	40,9	42,87	41,25	<b>325</b>
A134	96	73	-90,0	-90,0	-90,0	-101
A135	100	100	45,1	-90,0	-90,0	65
A136	100	100	44,4	40,82	40,86	<b>326</b>
A137	100	100	43,7	45,29	41,15	<b>330</b>

\* Valores da área da colônia micelial, obtidos pelo programa Quant (VALE et al., 2003) em comparação a testemunha que obteve uma área de 90 mm<sup>2</sup>.