

JONATAS DA SILVA CAMPOS

**CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS DE
Neonectria ditissima E CONTROLE QUÍMICO DE
CANCRO EUROPEU EM MACIEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Orientador: Amauri Bogo

Coorientador: Rosa Maria V. Sanhueza

LAGES, SC

2015

Campos, Jonatas da Silva

Características morfo-fisiológicas de *Neonectria ditissima* e controle químico de cancro europeu em macieira / Jonatas da Silva Campos. - Lages, 2015.

110 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Amauri Bogo

Coorientador: Rosa Maria Valdebenito-Sanhueza

Inclui bibliografia

Dissertação (mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal, Lages, 2015.

1. Macieira 2. Cancro europeu 3. *Neonectria ditissima* 4. Morfo-fisiologia 5. Fungicidas I. Campos, Jonatas da Silva. II. Bogo, Amauri. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pelo aluno.

JONATAS DA SILVA CAMPOS

**CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS DE
Neonectria ditissima E CONTROLE QUÍMICO DE
CANCRO EUROPEU EM MACIEIRA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Produção Vegetal, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Banca examinadora:

Orientador:

Prof. PhD. Amauri Bogo
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Prof. Dr. Ricardo Trezzi Casa
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membro:

Dr. Silvio André Meirelles Alves
Embrapa Uva e Vinho

LAGES, SC 09/07/2015

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar comigo desde minha existência.

A meus pais pelo respeito aos meus objetivos e anseios na vida.

À Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias – CAV, Lages-SC pelo ensino de qualidade.

A CAPES, pela disponibilização da bolsa de estudos.

Ao professor Dr. Amauri Bogo, meu orientador, pela orientação e respeito, sempre disponível para resolver tudo.

À Dra. Rosa Maria pelo conhecimento e ensinamentos fundamentais para o crescimento profissional.

Aos estagiários e funcionários do Centro de Pesquisa Proterra pelo auxílio nos experimentos e companheirismo.

Aos professores da universidade pelas aulas ministradas e trabalhos para o melhor aprendizado.

A minha irmã de coração Claudia Nunes, por estar pronta para ouvir e ajudar no que fosse preciso, sempre junto, sempre alerta. Ao Charles pelo carinho, respeito e paciência.

Aos colegas de Vacaria-RS e amigos do CAV pela diversão, companheirismo e risadas nas viagens.

As pessoas que fizeram parte de alguma forma, aplausos.

*“Quanto mais me
aprofundo no
conhecimento da ciência,
maior é minha crença de
que Deus é perfeito.”*

(Lucivana Mourão)

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Lesões de cancro europeu no tronco (A) e galho (B) de macieira cv. Gala em pomar de Vacaria/RS.....31
- Figura 2 – Podridão de cancro europeu em fruto de macieira cv. Gala em pomar de Vacaria/RS.....31
- Figura 3 – Câmara de Neubauer para avaliação de conídios.....44
- Figura 4 – Ferimentos tipo perfurações de 5,0 mm realizados nos frutos de maçã da cv. Gala.....48
- Figura 5 – Inoculação em ferimento de mudas de macieira cv. Gala com disco de micélio de 5,0 mm de *Neonectria ditissima* crescido em BDA (A). Floreiras com mudas de macieira da cv. Gala, utilizadas na sala de crescimento climatizada (B).....50
- Figura 6 – Tratamento por imersão de mudas de macieira cv. Gala por 15 e 60 minutos em calda de mistura de fungicidas (A) e plantio a campo das mudas após tratamento e inoculação com *Neonectria ditissima*.....52

Figura 7 – Colônias do isolado FROL 08 de *Neonectria ditissima* nos meios BDA (batata-dextrose-ágar), SN (SNAY) e AM (ágar extrato de malte) após 20 dias de incubação.....54

Figura 8 – Quantidade de esporodóquios por cm² de *Neonectria ditissima* nos cinco grupos de isolados de pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC com dez e 20 dias de incubação.....62

Figura 9 – Cor e formato dos esporodóquios de *Neonectria ditissima* nos meios BDA (A), SN (B) e AM (C).....63

Figura 10 – Média geral da quantidade de esporodóquios por cm² de *Neonectria ditissima* em três meios de cultura avaliados aos dez e 20 dias dos 35 isolados de pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC.....64

Figura 11 – Coloração característica das colônias de *Neonectria ditissima* e pigmentação em meio BDA (A), SN (B) e AM (C).....69

Figura 12 – Produção média de conídios dos isolados de *Neonectria ditissima* dos pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em um esporodóquio de 20 dias de idade cultivado nos meios de cultura BDA, SN e AM.....72

Figura 13 – Produção média de conídios dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em colônias cultivadas em meio BDA com sete dias de idade.....73

| | |
|---|----|
| Figura 14 – Médias do comprimento e largura de micro e macroconídios dos isolados de <i>Neonectria ditissima</i> nos meios de cultura BDA, SN e AM..... | 78 |
| Figura 15 – Variação no comprimento e largura de micro e macroconídios dos isolados de <i>Neonectria ditissima</i> em meio BDA..... | 79 |
| Figura 16 – Indicação do conídio de <i>Neonectria ditissima</i> Germinado (G) e Não-Germinado (NG)..... | 80 |
| Figura 17 – Taxa e média de germinação dos conídios de cinco isolados de <i>Neonectria ditissima</i> de cada pomar dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em 16 e 24 horas..... | 81 |
| Figura 18 – Percentual de inibição (%I) das colônias de três isolados de <i>Neonectria ditissima</i> em meio ágar extrato de malte (AM) com fungicidas incorporados..... | 83 |
| Figura 19 – Crescimento micelial de três isolados de <i>Neonectria ditissima</i> no meio ágar extrato de malte (AM) adicionado com fungicidas..... | 84 |
| Figura 20 – Maçãs das cvs. Gala (A) e Fuji (B) com sintoma de podridão causada pela inoculação dos isolados de <i>Neonectria ditissima</i> e colônias do reisolamento de confirmação de cada pomar dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC (C)..... | 88 |
| Figura 21 – Tamanho médio de lesões em mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com <i>Neonectria ditissima</i> e tratadas com fungicidas utilizados isoladamente. Ensaio sob condições controladas..... | 90 |

Figura 22 – Lesões retiradas das mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados isoladamente em ensaio sob condições controladas.91

Figura 23 – Lesões das mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados em mistura no ensaio do ano de 2013.....93

Figura 24 – Incidência de lesões nas mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados em mistura pelos períodos de 15 minutos (A) e 60 minutos (B) no ensaio do ano de 2013.....94

Figura 25 – Tamanho médio de lesões de cancro europeu em mudas de macieira da cv. Gala, inoculadas com isolados de *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas em misturas sob os períodos de 15 minutos (A) e 60 minutos (B) de antes do plantio a campo no ano de 2013.....96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e época de isolamento dos 35 isolados de *Neonectria ditissima*, obtidos de cancro de ramos de macieira da cv. Gala em pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC.....40

Tabela 2 – Fungicidas e concentração em ppm utilizada para eficiência *in vitro*.....47

Tabela 3 – Fungicidas utilizados isoladamente nos tratamentos de mudas de macieira cv. Gala em sala climatizada.....49

Tabela 4 – Fungicidas utilizados em mistura nos tratamentos de mudas de macieira cv. Gala plantadas a campo.....51

Tabela 5 – Crescimento micelial médio de 35 isolados de *Neonectria ditissima* de cinco pomares de macieira dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em três meios de cultura, após 20 dias de incubação a 22°C.....55

Tabela 6 – Grupos formados pelos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em ordem crescente de crescimento micelial médio (mm).....57

| | |
|--|----|
| Tabela 7 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos 35 isolados de <i>Neonectria ditissima</i> provenientes de cinco pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC após 20 dias de incubação..... | 59 |
| Tabela 8 – Coloração das colônias e pigmentação do meio dos três meios de cultura dos 35 isolados de <i>Neonectria ditissima</i> após 20 dias de incubação..... | 65 |
| Tabela 9 – Grupos dos 35 isolados de <i>Neonectria ditissima</i> em meio BDA agrupados de acordo com a coloração das colônias e pigmentação do meio após 20 dias de incubação..... | 70 |
| Tabela 10 – Tipo de conídio produzido nas colônias dos isolados de <i>Neonectria ditissima</i> em meio BDA com sete dias de idade..... | 73 |
| Tabela 11 – Comprimento e largura de microconídios dos isolados de <i>Neonectria ditissima</i> produzidos em colônias de 20 dias de idade nos meios de cultura BDA, SN e AM..... | 75 |
| Tabela 12 – Comprimento e largura de macroconídios dos isolados de <i>Neonectria ditissima</i> produzidos em colônias de 20 dias de idade nos meios de cultura BDA, SN e AM..... | 76 |
| Tabela 13 – Crescimento micelial de isolados de <i>Neonectria ditissima</i> em mm nos meios AM com fungicidas incorporados..... | 83 |

Tabela 14 – Médias das podridões em frutos das cvs. Gala e Fuji com ferimento dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em 14 dias de incubação.....86

Tabela 15 – Médias do tamanho das lesões de cancro europeu em mudas de macieira da cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas em misturas sob dois períodos de tempo antes do plantio a campo no ano de 2013.....95

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO..... | 19 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 22 |
| 2.1 A POMICULTURA..... | 22 |
| 2.1.1 Origem e classificação..... | 22 |
| 2.1.2 A Produção brasileira | 22 |
| 2.1.3 Manejo Integrado de Doenças | 24 |
| 2.2 CANCRO EUROPEU | 26 |
| 2.2.1 História | 27 |
| 2.2.2 Taxonomia..... | 28 |
| 2.2.3 Sintomatologia | 30 |
| 2.2.4 Epidemiologia..... | 32 |
| 2.2.5 Controle | 32 |
| 2.2.6 Fungicidas <i>versus</i> Fungos..... | 34 |
| 2.3 CANCRO EUROPEU NO BRASIL | 35 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS..... | 38 |
| 3.1 MATERIAL UTILIZADO | 38 |

| | |
|---|-----|
| 3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA.... | 39 |
| 3.3 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS <i>IN VITRO</i> | 46 |
| 3.4 AGRESSIVIDADE DOS ISOLADOS EM FRUTOS..... | 47 |
| 3.5 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS UTILIZADOS ISOLADOS E EM MISTURAS EM MUDAS INOCULADAS..... | 49 |
| 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 53 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 54 |
| 4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS ISOALDOS DE..... | 54 |
| 4.2 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS <i>IN VITRO</i> | 82 |
| 4.3 AGRESSIVIDADE DOS ISOLADOS DE <i>Neonectria ditissima</i> EM FRUTOS DAS CULTIVARES GALA E FUJI..... | 85 |
| 4.4 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS UTILIZADOS ISOLADOS E EM MISTURA PARA TRATAMENTO EM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM <i>Neonectria ditissima</i> | 89 |
| 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 98 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 100 |

RESUMO

CARACTERÍSTICAS MORFO-FISIOLÓGICAS DE *Neonectria ditissima* E CONTROLE QUÍMICO DE CANCRO EUROPEU EM MACIEIRA

A produção de maçãs (*Malus domestica* Borkh) é ameaçada por várias doenças, bem como pelas doenças quarentenárias. Em 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA confirmou casos de cancro europeu (*Neonectria ditissima*) nos estados do sul do Brasil. O cancro europeu pode causar a morte de mudas e danos e perdas de produção de frutos. Este trabalho teve como objetivos caracterizar a diversidade morfo-fisiológica de isolados associados ao cancro europeu nos municípios de Água Doce/SC e Vacaria/RS em meios de cultura e avaliar os efeitos de fungicidas em mudas de macieira inoculadas. Quatro experimentos foram realizados: (1) Caracterização morfo-fisiológica dos isolados e observações de conídios; (2) Eficiência de fungicidas *in vitro*; (3) Agressividade dos isolados em frutos; e (4) Eficiência de fungicidas, isolados em ambiente controlado e em mistura a campo, em mudas inoculadas com o patógeno. As avaliações morfo-fisiológicas foram feitas com base no crescimento micelial e Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) em meios de cultura, formação de estruturas, coloração das colônias e produção, tipo e tempo de germinação dos conídios. Para ensaio de eficiência dos fungicidas, doses em ppm foram incorporados em meio de cultura ágar malte e o crescimento micelial foi avaliado aos sete dias. A agressividade dos isolados foi testada em frutos das cvs. Gala e Fuji com inoculação em

ferimento. Os experimentos com fungicidas, isolados ou em mistura, foram realizados em mudas da cv. Gala de três anos de idade, tratadas, inoculadas através de ferimento após 24 hs e incubadas por 72 hs no escuro e posteriormente plantadas em vasos e a campo. Os isolados tiveram o maior crescimento micelial no meio BDA, com colônias de diâmetro maior de 60 mm, formando-se grupos com médias de 35,56 (G1), 52,71 (G2) e média de 62,67 mm (G3). O IVCM foi maior que 4,0 mm no meio BDA. A esporulação foi mais abundante no meio SNAY seguido do BDA e AM e a coloração micelial predominante no meio BDA foi de tons de bege e pigmentação central das colônias marrom com bordas em tons de bege. Os conídios foram do tipo macro (63,5x10,1, 62,3 x 10,6 e 59,7 x 10,3 μm em BDA, SN e AM) e micro (35,4 x 4,8, 35,2x5,2 e 34,8 x 5,2 μm em BDA, SN e AM). A germinação dos conídios foi verificada a partir de 16 hs em suspensão de conídios. O crescimento micelial foi menor nos fungicidas tebuconazole e tiofanato metílico no ensaio *in vitro* aos sete dias. Os isolados foram agressivos nas cvs. Gala e Fuji. Os fungicidas tebuconazole e tiofanato metílico utilizados isoladamente reduziram as lesões do cancro. Fosetil-Al, tiofanato metílico e fosfito de potássio em mistura, reduziram o tamanho das lesões e a mistura de captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio atrasou o início do aparecimento dos sintomas em 15 dias de acordo com a média do tamanho das lesões. A incidência das lesões foi acima de 65% aos 45 dias após a inoculação das mudas.

Palavras-chave: Macieira; cancro europeu; *Neonectria ditissima*; morfo-fisiologia; fungicidas.

ABSTRACT

Morpho-physiological characteristics of *Neonectria ditissima* and chemical control of European Canker in apple

The production of apples (*Malus domestica* Borkh) is threatened by various diseases, as well as by quarantine diseases. In 2012, the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA confirmed cases of European Canker (*Neonectria ditissima*) in the southern states of Brazil. The European canker can cause death of seedlings and fruit damage and production losses. This study aimed to characterize the morphological and physiological diversity of isolates associated with the European Canker in the counties of Água Doce/SC and Vacaria/RS in culture media and evaluate the effects of fungicides in apple seedlings inoculated. Four experiments were conducted: (1) Morpho-physiological characterization of isolates and observations of conidia; (2) *In vitro* fungicides efficiency; (3) Aggressiveness of isolates in fruits; and (4) Efficiency of fungicides, in a controlled environment isolated and mixed field, in inoculated seedlings with the pathogen. The morpho-physiological evaluations were made based on mycelial growth and Mycelial Index Growth Speed (MIGS) in culture media, structure formation, coloration of the colonies and production, type and time of spore germination. For the fungicides effectiveness test, doses in ppm was incorporated into malt agar culture and mycelial growth was evaluated at seven days. The aggressiveness of the isolates was tested in fruits of cvs. Gala and Fuji inoculated in injury. Experiments with fungicides, alone or in mixture, were performed on seedlings cv. Gala three

years old, treated, inoculated through injury after 24 hours and incubated for 72 hours in the dark and then planted in pots and in the field. The isolates had higher mycelial growth on the PDA, colonies with diameters of 60 mm, forming groups with an average of 35.56 (G1), 52.71 (G2) and an average of 62.67 mm (G3). The MIGS was greater than 4.0 mm in PDA. The sporulation was more abundant in the media SNAY followed by the PDA and AM and the predominant color mycelium in PDA was beige and central pigmentation of brown colonies with borders in shades of beige. Spores were macro type (63,5x10,1, 62.3 x 10.6 and 59.7 x 10.3 μm in PDA, SN and AM) and micro (35.4 x 4.8, 35,2x5 2 and 34.8 x 5.2 μm in PDA, SN and AM). Germination of conidia was observed from 16 hours in a fungal suspension. The mycelial growth was lower in tebuconazole and methyl thiophanate fungicides *in vitro* assay to seven days. The isolates were aggressive in cvs. Gala and Fuji. The tebuconazole and methyl thiophanate fungicides used alone reduced the cancer lesions. Fosetyl-Al, methyl thiophanate and potassium phosphite mixture, reduced lesion size and mixing captan, methyl thiophanate and potassium phosphite delayed the early onset of symptoms at 15 days according to the average size of the lesions. The incidence of lesions was above 65% at 45 days after inoculation of the seedlings.

Keywords: Apple; European canker; *Neonectria ditissima*; morpho-physiology; fungicides.

1 INTRODUÇÃO

O cenário da evolução da pomicultura no Brasil começou na década de 1970, onde seu desenvolvimento comercial se deu com a iniciativa de alguns produtores de Santa Catarina e com o apoio do governo do estado. Então, órgãos federais e estaduais passaram a executar o Projeto de Fruticultura de Clima Temperado – Profit, o qual previa o plantio de 3.150 ha de macieira até 1975. Dessa forma, o Brasil começou a ser país exportador da fruta e não somente importador (BONETI et al., 2006).

Segundo dados do United States Department of Agriculture – USDA (BRASIL, 2013a), a produção mundial de maçãs para a safra 2012/2013 chegou a mais de 67 milhões de toneladas. A China lidera nos quesitos produção, com 38 milhões de toneladas (2012/2013), consumo e processamento nos últimos seis anos (BRASIL, 2013a).

No Brasil, a região sul é a principal produtora de maçã (*Malus domestica* Borkh), englobando os estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Essa região destaca-se pelas condições climáticas para a produção, bem como pela estrutura e potencial de comercialização. A área plantada de macieira passa de 38 mil hectares nos estados da região sul. De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, a produção chegou a mais de 1,3 milhão de toneladas nos últimos anos, sendo a maior parte distribuída em Santa Catarina em uma área de aproximadamente 19 mil hectares (IBGE, 2014).

A produção no Brasil é alicerçada em cultivares de apreciação universal (Fuji e Gala), as quais possuem teores de acidez e sólidos solúveis totais (SST) balanceados, sendo caracteristicamente muito saborosas (BALBACH e BOARIN, 1995; BLEICHER, 2006).

Contudo, o consumo da fruta no Brasil é muito baixo, sendo 5,78kg/habitante/ano em 2012. Países como Argentina e Chile também têm consumo maior que o Brasil, sendo 13,4kg/habitante/ano e 9,9kg/habitante/ano respectivamente segundo a FAO (BRASIL, 2013a; FAO, 2010).

Ainda, existem dificuldades de manejo que afetam a produção de maçãs. Os principais problemas são os fitossanitários, onde a cultura da macieira é acometida por várias doenças como a sarna, mancha da gala, podridões, doenças de pós-colheita e outras, as quais devem ser controladas por técnicas de manejo ou uso de produtos químicos. Além das doenças atuais, existe ainda o potencial de introdução de novas doenças (quarentenárias), sendo uma constante ameaça, em que os órgãos de fiscalização sanitária devem estar atentos para evitar tal situação.

No ano de 2012, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA confirmou casos de cancro europeu (*Neonectria ditissima* Tul. e C. Tul.) nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, sendo reconhecida como praga quarentenária A1 no Brasil (BRASIL, 2013b).

O cancro europeu pode causar a morte de plantas com infecções no ponto de abscisão das folhas, gemas e lesões ou cortes de poda, sendo as mudas as mais sensíveis (EPAGRI, 2012). O patógeno sobrevive durante o outono na forma de peritécio, o qual libera os esporos sexuados através da umidade e causam novas infecções em pontos de ferimento das plantas (SANHUEZA, 1998).

Dessa forma, por ser uma doença quarentenária, não há informações sobre sua evolução e epidemiologia nas condições climáticas do Brasil. A realização de pesquisas e estudos sobre o agente etiológico e epidemiologia da doença nas regiões produtoras de maçã

é necessária, a fim de serem avaliadas técnicas de manejo e controle adequadas para redução dos danos e perdas pela doença.

Os objetivos do presente trabalho são a caracterização da morfologia e fisiologia do fungo, que está relacionada à correta associação do patógeno a doença do cancro europeu em relação à coloração de colônias e produção de conídios em diferentes meios de cultura. Também, através da caracterização morfo-fisiológica, é pertinente a constatação se há diferença entre os isolados coletados nos municípios dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. O efeito da aplicação de fungicidas tem o objetivo de verificar a eficiência na proteção e controle das infecções de *N. ditissima* em mudas inoculadas e mantidas em condições controladas e a campo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A POMICULTURA

2.1.1 Origem e classificação

A origem da macieira ocorreu entre as regiões do Cáucaso, Ásia central e leste da China, atribuindo aos povos euro-asiáticos a disseminação das formas ancestrais das macieiras atuais, a mais de 20 mil anos. São encontrados vestígios do cultivo da macieira entre o período de 400 a 800 d.C., em mosteiros e conventos no sul da atual Alemanha. Alguns séculos mais tarde, a nobreza e o clero decretava a implantação de pomares demonstrativos com a utilização de variedades melhoradas, em troca da redução de impostos (BLEICHER, 2006).

Sendo uma espécie de fruteira lenhosa, a macieira é uma planta perene de folhas caducas, que entra em estado de dormência na estação do inverno. É uma fruteira de clima temperado que se adapta a diferentes climas, desde trópicos a altas latitudes. Pertence à família das Rosáceas, na ordem Rosales, subfamília Pomoideae e gênero *Malus*. A macieira já teve vários nomes, sendo *Malus domestica* Borkh a denominação válida para a macieira cultivada, de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura para Plantas Cultivadas (IUCHI, 2006; PETRI e LEITE, 2008).

2.1.2 A Produção brasileira

Entre as quatro frutas mais consumida no mundo, a maçã é a fruta de clima temperado de grande importância como fruta fresca, comercializada nos doze meses do ano e distribuída em todo Brasil (PETRI e LEITE, 2008). O Brasil destaca-se entre os maiores

produtores de frutas do mundo, onde os estados do sul reúnem grandes produções de frutas de clima temperado, sendo a maçã a principal. O país é o terceiro colocado no ranking mundial de frutas frescas, com 5,7% do total mundial, correspondendo a pouco mais de 41,5 milhões de toneladas, segundo a FAO (2009).

No Brasil a produção de maçãs concentra-se na região sul por apresentar vantagens, como clima adequado e estrutura de logística e de comercialização, tornando essa região a principal produtora. No Estado de Santa Catarina, as cidades de São Joaquim e Fraiburgo são os municípios polos de produção. No Rio Grande do Sul destacam-se os municípios de Vacaria e Bom Jesus e no Paraná a região de Palmas.

A produção de maçãs alcançou mais de 1,3 milhão de toneladas nos últimos anos, colocando o país em 9º lugar na produção mundial da fruta (BRASIL, 2013a). Os dados mostram uma área que passa de 38 mil hectares de macieiras plantadas, onde o estado de Santa Catarina possui a maior área com 19 mil ha, o Rio Grande do Sul com 18 mil ha e Paraná com área de 1,7 mil ha (IBGE – LSPA, 2014).

Um dos fatores bem sucedidos da cultura da macieira no Brasil é a utilização de cultivares com grande aceitação comercial. As cultivares Gala e Fuji apresentaram nível internacional de apreciação, tornando-se bastante promissoras. No país, a cultivar Gala representa cerca de 60% da produção, enquanto que a Fuji em torno de 30% (PETRI et al., 2011).

Na década de 1980, com a introdução dos clones das cultivares Gala e Fuji, como Maxi Gala e Fuji Suprema que possuem melhor coloração, o Brasil consolidou-se com as exportações, atendendo as exigências do mercado externo. Ainda, os avanços tecnológicos tiveram um papel importante para o sucesso da pomicultura no país (PETRI et al., 2011).

O país com 20 anos de produção comercial (1970) passou a ser exportador na década de 1990, ao invés de somente importador da fruta. Com isso, ocorreu a geração de empregos em áreas pouco industrializadas, tornando o setor num importante empregador e representante de um enorme segmento do agronegócio na fruticultura brasileira (PROTAS e SANHUEZA, 2003; PETRI e LEITE, 2008).

Para tanto, a produção em grande escala de maçãs deve seguir normas para obter-se frutas de qualidade comercial. Maçãs livres de doenças e podridões, com aspectos de coloração e de nutrição adequados ao mercado consumidor, são o resultado de um pomar bem cuidado. Dessa maneira, o manejo deve ser feito de forma integrada, aliando boas práticas culturais e aplicação correta de produtos químicos.

2.1.3 Manejo Integrado de Doenças

A produtividade das plantas de maçã é afetada por diversos fatores de ordem biótica e abiótica. Dentre as principais dificuldades estão às doenças. Segundo Agrios (2005), doença é o mau funcionamento de células e tecidos da planta que está em contato direto com um agente patogênico ou um fator ambiental, desenvolvendo sintomas. Em resumo, é uma alteração nos processos fisiológicos da planta, de forma contínua, que leva a um desequilíbrio energético da planta (KRUGNER, 1995).

As doenças podem reduzir a capacidade de produção das plantas causando a morte em alguns casos. Conforme Sanhueza et al. (2006), as principais doenças da macieira como a sarna, mancha da gala, podridão amarga, podridão branca, podridão olho-de-boi e podridões pós-colheita, causam grandes danos na produção comercial de maçãs.

Nas condições climáticas favoráveis da região sul, o uso de defensivos agrícolas é uma das opções mais eficientes para o tratamento de doenças, de forma pertinente, com seleção adequada de ingredientes ativos e correto momento de aplicação. Dessa maneira, minimizam-se os efeitos negativos sobre o ambiente e saúde humana, obtendo frutos com melhor qualidade sem afetar a produtividade (STADNIK, MONDINO e BUTIGNOL, 2009). Com base nesses fatores, foi criado no final da década de 90 o programa de Produção Integrada de Frutas (PIF) como um sistema de medidas que visa indicar o melhor manejo da produção. A Produção Integrada representa um conjunto de técnicas voltadas à produção de alimentos de alta qualidade, utilizando técnicas de manejo das culturas que assegurem a manutenção dos mecanismos de regulação natural da cultura e das pragas para garantir o uso mínimo de agroquímicos no controle de pragas, e que os produtos permitidos sejam os menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente (PROTAS e SANHUEZA, 2003).

Entretanto, não obstante das atuais doenças, a pomicultura brasileira está em ameaça constante da introdução das doenças quarentenárias, que obrigam os órgãos governamentais a adotar medidas de barreiras fitossanitárias, a fim de evitar a entrada delas no país. Porém, mesmo com a intensa ação destas barreiras, em 2012 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA confirmou casos do cancro europeu em plantas de macieira, causado pelo fungo *Neonectria ditissima* (Tulani e C. Tulani, sinônimo *Neonectria galligena* (Bress)) (BERESFORD, 2012).

A doença foi confirmada como praga quarentenária presente no Brasil, conforme a Instrução Normativa Nº 12, de 23 de maio de 2014. Em 2012, o MAPA instituiu o Programa Nacional de Prevenção e Controle do Cancro Europeu das Pomáceas – PNCEP

(instrução normativa N° 20 de 20 de junho de 2013), que estabelece critérios e procedimentos para a contenção da praga e, ainda, forma um grupo com o objetivo de propor, acompanhar e avaliar ações para o desenvolvimento do PNCEP no Brasil (BRASIL, 2013b; BRASIL, 2014a).

2.2 CANCRO EUROPEU

O cancro europeu, também conhecido como cancro das macieiras ou cancro por nectria, é causado pelo fungo *Neonectria ditissima* que pode ser encontrado em viveiros de mudas de macieira, bem como em pomares estabelecidos. Esta doença pode ocasionar prejuízos com graves efeitos para o produtor, economia e, conseqüentemente, na cadeia produtiva da macieira.

Em regiões de clima úmido e chuvas abundantes, a doença pode causar danos significativos na produtividade, acarretando até mesmo na remoção do pomar pelo alto nível de contaminação. Geralmente, a infecção inicia no outono através de ferimentos de queda das folhas ou lesões pelo corte de poda, entre outras (VALDEBENITO-SANHUEZA e BETTI, 2005).

O fungo cresce no tecido lenhoso, atingindo as camadas mais internas, formando um calo e, posteriormente, expõe o tecido dos vasos condutores de seiva, criando um cancro (CREEMERS, 2014). Esses cancros podem afetar ramos de um ou mais anos, além de levar mudas à morte, causando estrangulamento. Ainda, o fruto também pode ser infectado pelo cálice ou outro ferimento, onde desenvolve uma podridão firme e de cor marrom-escura que deprecia o fruto (VALDEBENITO-SANHUEZA e BETTI, 2005).

Várias plantas são afetadas pelo *N. ditissima*. Pereiras, salgueiros, papoulas, e espécies de árvores ornamentais, como acer, estão entre os hospedeiros (SWINBURNE, 1975).

2.2.1 História

O cancro europeu já vem sendo estudado a mais de um século como uma doença importante em plantas. Inicialmente, ele apareceu na literatura europeia sendo chamado pelo termo “cancro”. Segundo Zeller (1926), o cancro era uma doença de espécies florestais e já era conhecido por muitas décadas antes do ano de 1865, quando foi descrito o fungo *Nectria ditissima* por Tulani como agente causal. Era amplamente disseminado em várias partes da Europa, afetando vários hospedeiros (ZELLER, 1926).

Também, Zeller (1926) menciona que desde a década de 1860 até 1904, já havia trabalhos de pesquisa sobre o patógeno mostrando que existiam dois a três fungos distintos nos cancros e que os conídios de *N. ditissima* causavam doença também em maçãs e em galhos de macieira. Os trabalhos indicaram que o patógeno só causava doença por meio de ferimentos por cortes, picadas de insetos, lesões de granizo, entre outros (ZELLER, 1926).

Paddock (1900) relatou a presença de cancro em ramos de macieira na América do Norte, em amostras de ramos das cidades de Nova Scotia e New York no ano de 1899. A confirmação foi por meio de publicação em forma de boletim, com descrição de detalhes da lesão e ilustrações de ramos com cancro. Já era referido como uma séria doença da maçã na Europa (PADDOCK, 1900). Após esta constatação, a partir de 1909, foram observadas a presença do cancro em várias partes dos

Estados Unidos e Canadá, com a emissão de relatórios para informação e conhecimento (ZELLER, 1926).

Em 1917, o cancro já era a doença mais destrutiva e perigosa entre todas as doenças de frutas na Europa, com a morte de muitas plantas no auge de produção. Bailey (1917) cita que em algumas localidades o cultivo da macieira já era tido como problema devido aos estragos causados pela doença. Além disso, o cancro também era encontrado em outras árvores frutíferas como pereiras, cerejeiras, limoeiros entre outras (BAILEY, 1917). A partir de então, o cancro europeu constituiu a mais grave doença de frutas na Europa, mas, na América, não havia chegado a grandes proporções de gama de hospedeiros e contaminações (BAILEY, 1917; ZELLER, 1926).

Atualmente (2015), o patógeno está presente em países europeus como Alemanha, França, Holanda, Itália, entre outros, na América do Norte, englobando Canadá e Estados Unidos, na América do Sul está presente no Chile, Argentina, Brasil e Uruguai, ainda, na África do Sul, Nova Zelândia e alguns países Asiáticos (ALVES, 2013).

Na Nova Zelândia, a doença é favorecida pelas temperaturas moderadas (15 à 25° C) e precipitações anuais médias superiores a 1000 mm. Com isto, o controle do cancro europeu torna-se mais difícil nos pomares daquele país (BERESFORD, 2012).

2.2.2 Taxonomia

O fungo *N. ditissima* pertence ao Reino Fungi, Filo Ascomycota, Ordem Hypocreales, Família Nectriaceae e Gênero *Neonectria*. A doença cancro europeu também é conhecida pelos nomes de cancro de nectria, cancro da maçã e podridão de nectria (fruto) (EDWARDS, 2013).

A partir de 1901, o nome do patógeno causador do cancro mais usado e aceito era *Nectria galligena* Bress (ZELLER, 1926). A nomenclatura do fungo passou por várias mudanças durante vários anos. Então, pesquisadores dos Estados Unidos analisaram as características e dividiram o gênero em dois grupos: *Nectria* e *Neonectria* (BERESFORD, 2012).

A primeira mudança na taxonomia do patógeno ocorreu em 1999, sendo chamado de *Neonectria galligena* ao invés de *Nectria galligena*. Alguns anos depois, em 2006, os mesmos pesquisadores observaram a necessidade de alterar novamente a nomenclatura do fungo, pois existia uma denominação e descrição mais antiga e correta da espécie, descrita por Tulani como *Nectria ditissima*, em 1865 (BERESFORD, 2012). Assim, o nome aceito para a fase sexuada do patógeno é *Neonectria ditissima* Tul. e C. Tul., e a fase assexuada é denominada como *Cylindrocarpon heteronema* Berk e Broome (SAMUELS et al., 2006).

O patógeno do cancro europeu possui fase sexuada e assexuada. Nessas fases são formados dois tipos de esporos: ascósporos e conídios.

Na fase sexuada ou perfeita, é caracterizado por apresentar peritécios esféricos, no tamanho de 300-400 μm e de cor avermelhada, que podem estar presentes durante todo o ano, principalmente no outono, acumulados na superfície da lesão do cancro. Nessas estruturas estão as ascas que contêm, geralmente, oito ascósporos. Estes esporos são de forma elipsoidal, formados por duas células, 14-20 x 5-7 μm de tamanho e hialinos. Na primavera, são liberados por uma massa gelatinosa que se concentra na superfície do peritécio (OGAWA e ENGLISH, 1991).

Na fase assexuada ou imperfeita, o fungo *Cylindrocarpon heteronema* (Berk. e Broome) está sob a forma de micélio de cor branca a amarelo claro. O

emaranhado de micélios na superfície do cancro formam os esporodóquios de cor amarelo claro a laranja e aveludados. Neles, principalmente são produzidos os conídios de tamanhos macro e micro. Os macroconídios são cilíndricos, com 52-62 x 4,5-55 µm de tamanho e levemente curvados. Possuem de 3 a 7 septos e são hialinos. Já os microconídios, são de tamanho 4-7 x 1-2 µm, unicelulares e hialinos (ZELLER, 1926; OGAWA e ENGLISH, 1991).

2.2.3 Sintomatologia

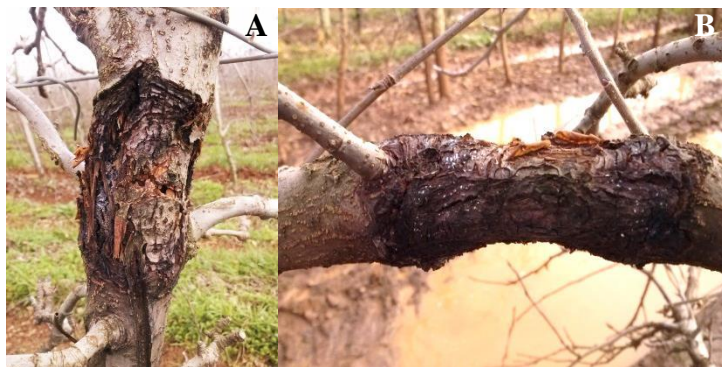
A infecção ocorre através de ferimentos e lesões naturais da planta. O patógeno penetra em lesões pela abscisão das folhas, na base das gemas, cortes de poda ou qualquer outro ferimento na planta de macieira (SANHUEZA, 1998).

Os primeiros sintomas visíveis da infecção começam inicialmente com manchas de cor avermelhada a marrom-escura na casca do ramo ou tronco. A lesão aumenta de tamanho evoluindo para uma depressão de cor marrom-escura tomando a forma elíptica, formando um cancro (SANHUEZA, 1998).

O patógeno penetra nos tecidos mais internos, no cambio, secando ou trincando a casca que solta como papel, deixando visível o lenho no tronco e ramos, também causando um estrangulamento e morte do ramo (WEBER, 2014). Ainda, conforme Weber (2014), esses sintomas são mais frequentes na primavera a partir da floração, mas podem surgir em qualquer época do ano com temperaturas amenas (Figura 1).

Creemers (2014) descreve que a infecção ocorre em pré-colheita de frutos, sendo visível em algumas semanas, onde desenvolve uma podridão de cor marrom-escura e firme, pela infecção do cálice, lenticelas ou outro ferimento (Figura 2).

Figura 1 – Lesões de cancro europeu no tronco (A) e galho (B) de macieira cv. Gala em pomar de Vacaria/RS.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Figura 2 – Podridão de cancro europeu em fruto de macieira cv. Gala em pomar de Vacaria/RS.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

2.2.4 Epidemiologia

Os conídios de *N. ditissima*, quando em contato com o ferimento, germinam em poucas horas em condição favorável de temperatura e molhamento. Eles colonizam as células do córtex do tronco ou ramo, sendo visualizado os primeiros sintomas em até 15 dias. Conforme Sanhueza (1998), temperaturas de 14°C a 15,5°C e molhamento de seis horas na primavera são favoráveis para dar início às infecções.

Com molhamento constante, o micélio (*C. heteronema*) cresce pelas células do córtex, soltando a casca. Na lesão, entre as fendas da casca, formam-se os esporodóquios e conídios em algumas semanas. Os conídios são disseminados para outras e para a mesma planta através de respingos de água e vento (ZELLER, 1926; OGAWA e ENGLISH, 1991).

O micélio persiste debaixo da casca dos ramos ou tronco da planta no verão e forma os peritécios (*N. ditissima*) no outono. Os ascósporos são forçados para fora do peritécio em uma massa gelatinosa que contém as ascas durante um período de umidade. São dispersos através de respingos de chuva, bem como por vários quilômetros de distância pelo vento (BAILEY, 1917; SANHUEZA, 1998; TURECHEK, 2004). Swinburne (1975) cita que os peritécios não são formados durante o primeiro ano de uma infecção.

2.2.5 Controle

De acordo com Zeller (1926), desde meados de 1710 já eram realizadas práticas de controle do cancro da maçã, assim conhecido. Por meio do controle cultural, era feita a eliminação de ramos e frutos doentes da planta. Após dois séculos, essa prática ainda era realizada, mas com a proteção do ferimento e desinfecção

do tecido com mistura bordalesa (ZELLER, 1926). Com isso, já eram observadas a diminuição na produção de esporos pelo patógeno.

Os métodos de controle para áreas que apresentam a doença do cancro europeu abrangem a limpeza das plantas, através da remoção de ramos com cancos, frutos com podridão, bem como eliminação das plantas com alto nível de infecções. A retirada dos restos de poda de ramos com cancro é de extrema importância, pois o fungo produz esporos que podem causar novas infecções (SWINBURNE, 1975; SANHUEZA, BONETI, ALVES, 2012).

Em cancos menores, Ashcroft (1934) mencionou a remoção de todo o tecido doente, desde que a ferida deixada não prejudique o vigor do ramo ou árvore. Ainda, Alves (2013) cita que os ferimentos devem ser tratados com fungicidas curativos, pastas fungicidas, tinta com fungicida, entre outros materiais para proteção. O material infectado é retirado do pomar e queimado para redução e eliminação da fonte de inóculo (ASHCROFT, 1934; ALVES, 2013).

No controle químico do cancro europeu são utilizados fungicidas tópicos e sistêmicos. Os fungicidas tópicos tem ação protetora, atuando na proteção da camada superficial do tecido antes da deposição do inóculo. Esses protetores são inibidores inespecíficos de reações bioquímicas no fungo e por esta razão não são absorvidos pela planta. Já os sistêmicos podem agir de forma curativa, pois são translocados dentro planta via sistema vascular. Eles inibem processos metabólicos específicos contra o patógeno a ser afetado (KIMATI, 2011).

Conforme Swinburne (1975), a aplicação de fungicidas a base de cobre no outono e em 50% de queda de folhas, promove proteção na ferida exposta pela queda do órgão. Também, fungicidas do grupo dos

benzimidazóis, que agem de forma sistêmica, geralmente são mais aplicados na primavera ou verão contra as infecções do cancro europeu (SWINBURNE, 1975).

Alves (2013) menciona que tratamentos com fungicidas de ação protetora, como captana, clorotalonil ou calda bordalesa, utilizados nas fases de queda de folhas no outono, nas porcentagens de 10, 50 e 90% de queda e início da brotação na primavera, podem ser empregados como medidas de prevenção. Ainda, na fase de 50% de queda de folhas, os locais de abscisão das folhas podem ser protegidos com fungicida protetor associado a um fungicida sistêmico. A utilização de tratamento fungicida de ação curativa no estadio de queda de pétalas das flores e quando verificada podridão nos frutos, pode diminuir e controlar futuras infecções de *N. ditissima* pelo cálice (ALVES, 2013).

Ações de prevenção e curativas também precisam ser realizadas frequentemente em viveiros de mudas. A pulverização com fungicidas protetores devem ser alternadas com curativos em mudas. Ferimentos não cicatrizados precisam ser protegidos com aplicação de protetores ou curativos em até sete dias após a prática que causou a lesão. Além disso, os viveiros devem estar localizados, no mínimo, a 10 km de distância de pomares com cancro europeu (ALVES, 2013; BRASIL, 2013b).

2.2.6 Fungicidas *versus* Fungos

Mesmo com a diversidade de opções de fungicidas no mercado, os fungos ainda podem adquirir resistência às moléculas do ingrediente ativo desses produtos. Isso é evidenciado pela ineficácia de muitos tratamentos, seja pelo uso constante de uma mesma formulação ou por doses inadequadas.

Conforme Agrios (2005) e Kimati (2011), os fungos são geneticamente maleáveis, assim como todos os organismos vivos. Desse modo, os fungos podem se tornar resistentes aos fungicidas sistêmicos, onde são usados extensivamente para o controle, visto que, são específicos e afetam um ou poucos processos metabólicos vitais. O resultado é o surgimento de uma população resistente por uma única mutação ou por seleção de indivíduos resistentes (AGRIOS, 2005).

Assim, as estratégias para prevenção da resistência podem estar aliadas a uso de fungicidas tópicos em doenças que podem ser controladas com eles, como também combinadas com outros métodos de controle. Ainda, a pressão de seleção do patógeno pode ser diminuída com a restrição da aplicação do fungicida em períodos críticos, escolha de método de aplicação que minimize a exposição do patógeno ao fungicida, usar dois fungicidas específicos em sequência e não em mistura, entre outras ações (KIMATI, 2011).

2.3 CANCRO EUROPEU NO BRASIL

A doença cancro europeu foi oficializada no Brasil em 2012. Porém, em 2002 foi constatada alta incidência da doença em um pomar com três anos de implantação próximo a um viveiro, no município de Vacaria, Rio Grande do Sul. Segundo Sanhueza (2014), sem fiscalização e plano de contingência, o patógeno foi disseminado e em 2009 foi detectada pelo MAPA a ocorrência generalizada nos estados do sul.

Ao redor do pomar onde a doença foi constatada em 2002, o patógeno já estava altamente disseminado. A distribuição para os outros estados se deu pela comercialização de mudas infectadas dos viveiros de Vacaria/RS. Em 2012 o MAPA iniciou um plano de contenção da doença, através da Instrução Normativa Nº

20, que instituiu o Programa Nacional de Prevenção e Controle do Cancro Europeu das Pomáceas – PNCEP (SANHUEZA, 2014).

O PNCEP tem o objetivo de estabelecer critérios e procedimentos para contenção da praga por meio de documentação de controle e rastreabilidade da produção e comercialização de frutos e material propagativo. Estabelece também, medidas de prevenção e controle em pomares com aplicação de fungicidas, limpeza e eliminação de ramos infectados. Ainda, cria um grupo para acompanhar e avaliar as ações práticas e de desenvolvimento do PNCEP no Brasil (BRASIL, 2013b).

As infecções por *N. ditissima* são favorecidas pelas condições climáticas conjuntas de temperatura, chuvas e umidade relativa. As temperaturas amenas são propícias para o desenvolvimento e esporulação do patógeno. De acordo com Zeller (1926), as chuvas e a alta umidade relativa mantêm a superfície das lesões/ferimentos de ramos ou troncos úmidas o suficiente para que ocorra a germinação dos esporos e colonização das células do córtex.

Estas condições ambientais de predisposição estão presentes praticamente o ano inteiro no Brasil. Segundo Sanhueza (2014), no verão é possível encontrar as fases sexuada e assexuada do patógeno nos pomares, sendo que na Europa encontra-se a fase sexuada apenas no fim do inverno.

Pesquisas estão sendo realizadas em diversas partes do mundo sobre o cancro europeu, de modo a definir estratégias de controle e eliminação da doença nos pomares de maçãs. Vários fatores, em diferentes intensidades, afetam a ocorrência e sobrevivência do patógeno.

No Brasil, ainda são poucas as pesquisas sobre o agente causal do cancro europeu. Assim, o conhecimento sobre o fungo *N. ditissima* e o comportamento e ocorrência da doença nos pomares, torna-se essencial na região sul do Brasil.

Através da condução de pesquisas, será possível delinear técnicas mais eficientes e rápidas para o manejo e controle da doença. Dessa maneira, buscam-se alternativas para evitar novos focos do cancro europeu em outras áreas ou plantas, de forma que não comprometa a produção e comercialização de maçãs e mudas dentro das áreas produtivas do Brasil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Centro de Pesquisa Proterra – CPPro, no município de Vacaria – RS.

Em laboratório, foram conduzidos experimentos de morfologia e fisiologia do fungo em meios de cultura e tratamento de mudas em condições controladas. A campo foram realizados os ensaios com mudas inoculadas para verificação do efeito dos fungicidas sobre as infecções.

3.1 MATERIAL UTILIZADO

Meios de cultura batata-dextrose-ágar (BDA), ágar extrato de malte (AM) e sintético SNAY (SN) foram utilizados para avaliação morfo-fisiológica. Os meios foram preparados para um litro de água destilada de acordo com:

1. BDA: 200 mL caldo de batata, 18 g de dextrose (glicose), 18 g de ágar;
2. AM: 25 g de extrato de malte, 18 g de ágar;
3. SN: 1 g de fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), 1 g de nitrato de potássio (KNO_3), 1 g de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 0,5 g de cloreto de potássio (KCl), 0,5 g de dextrose (glicose), 0,2 g de sacarose, 1g de extrato de levedura, 18 g de ágar.
4. Caldo Malte: 25 g de extrato de malte.
5. BDA ácido: adição de 1 mL / L de ácido láctico no meio BDA antes de vertê-lo nas placas.

Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C durante 20 minutos e mantidos em temperatura ambiente até o momento de vertê-los nas placas de Petri.

Foi utilizada solução de lactoglicerol para paralisar o tubo germinativo no teste de germinação de

conídios. A solução foi preparada com 0,01 g de pó de azul de metileno, 20 mL de ácido láctico, 40 mL de glicerol (glicerina) e 20 mL de água destilada. O pó de azul de metileno foi diluído na água destilada e depois misturados os outros reagentes. A solução foi guardada em vidro de cor âmbar até o momento do uso.

3.2 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA

3.2.1 Isolamento de *Neonectria ditissima*

Foram obtidos 35 isolados em cinco pomares de macieiras da região sul do país, nos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC (Tabela 1) e preservados na micoteca do Centro de Pesquisa Proterra – CPPro, Vacaria/RS.

Os isolados foram obtidos de ramos de macieira da cultivar Gala com lesão de cancro europeu, utilizando metodologia adaptada de Alfenas et al. (2007). Superfície dos ramos foram desinfestadas com algodão em álcool etílico hidratado 92°. Fragmentos do tecido da epiderme da área de transição da lesão do cancro foram retirados com lâmina de bisturi esterilizada e colocados em meio de cultura BDA acidificado em placas de Petri de 90x15 mm de poliestireno e, posteriormente, mantidas em incubadora do tipo BOD (Biochemical oxygen demand) à temperatura de 22°C com fotoperíodo de 24 hs. Colônias de cinco dias de crescimento dos diversos fragmentos de ramos foram transferidas para meio BDA e incubadas em BOD à 22°C, para crescimento de colônias puras.

Conforme metodologia de preparo de suspensões adaptada de Fernandez (1993), de uma colônia pura de cada isolado de ramo, retirou-se após o crescimento de 15 dias, esporodóquios que foram macerados em almofariz com auxílio de um bastão de porcelana, e raspagem da colônia com lâmina de bisturi esterilizada,

em placa com 5 mL de água destilada esterilizada (ADE). A água da raspagem foi misturada no almofariz com os esporodóquios macerados, formando uma suspensão que foi filtrada em gaze esterilizada para um becker. A suspensão foi suplementada com 0,02 mL de Tween 80 (polissorbato 80), agitada manualmente para homogeneização. A concentração de conídios foi ajustada pela leitura em câmara de Neubauer (hemocitômetro) no microscópio óptico, com adição de ADE para concentração final de 1×10^4 conídios/mL. Uma amostra de 0,1 mL da suspensão de cada isolado foi distribuída em meio de cultura BDA numa placa de Petri com auxílio de uma alça de vidro e incubada em BOD com temperatura de 22°C. Após o crescimento das colônias monospóricas, discos de 5 mm de BDA com micélio foram transferidos para placas pequenas (49x13 mm) com meio de cultura BDA para preservação dos isolados em incubadora BOD, à 4°C e sem fotoperíodo.

Tabela 1 – Origem e época de isolamento dos 35 isolados de *Neonectria ditissima*, obtidos de cancro de ramos de macieira da cv. Gala em pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC. (Continua...)

| Código Isolado | Localidade | Mês/Ano |
|-----------------------|-------------------|----------------|
| NR02 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| NR03 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| NR05 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| NR10 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| FR04 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| FR10 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| FR14 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| FR15 | Vacaria/RS | Fev/2013 |
| CPi01 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi02 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi03 | Vacaria/RS | Nov/2013 |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 1 – Origem e época de isolamento dos 35 isolados de *Neonectria ditissima*, obtidos de cancro de ramos de macieira da cv. Gala em pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC. (Conclusão)

| Código Isolado | Localidade | Mês/Ano |
|-----------------------|-------------------|----------------|
| CPi05 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi06 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi09 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi10 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi14 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi16 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| CPi17 | Vacaria/RS | Nov/2013 |
| AD03 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| AD04 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| AD05 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| AD06 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| AD07 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| AD08 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| AD10 | Água Doce/SC | Jun/2014 |
| FROL01 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL02 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL03 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL04 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL05 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL06 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL07 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL08 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL09 | Vacaria/RS | Jul/2014 |
| FROL10 | Vacaria/RS | Jul/2014 |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

3.2.2 Crescimento micelial

Discos de micélio de 5,0 mm de diâmetro em meio BDA foram retirados das bordas das colônias puras dos isolados com auxílio de um perfurador e removidos para substituir discos dos meios de igual tamanho, retirados do centro das placas de Petri contendo três meios de cultura: BDA, SN e AM. Após, as placas

ficaram incubadas em BOD a 22°C com fotoperíodo contínuo.

A avaliação do crescimento micelial foi realizada a cada três dias durante 12 dias, pela obtenção do crescimento micelial através de paquímetro digital e foi fixado valor igual ou maior de 60,0 mm como maior crescimento ao final da avaliação. A primeira e a última avaliação do crescimento foram utilizadas no cálculo do índice de velocidade do crescimento micelial, conforme adaptação da fórmula citada por Dias (2005):

$$\text{IVCM} = \frac{(D-Da)}{n}$$

IVCM = índice de velocidade de crescimento micelial

D = diâmetro médio da colônia da última avaliação

Da = diâmetro médio da colônia da primeira avaliação

n = número de dias após a repicagem

Foi fixado valor igual ou maior que 4,00 mm para a maior interação entre os isolados e os três meios de cultura avaliados.

3.2.3 Formação de estruturas

A observação da formação de estruturas do tipo esporódquio nos três meios de cultura foi realizada aos dez e 20 dias após a incubação das placas de Petri do ensaio de crescimento em BOD. A avaliação foi feita com a contagem da quantidade de esporódquios em 1 cm² nas duas datas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com repetições de quatro placas por isolado nos três meios avaliados.

3.2.4 Coloração das colônias

Foi verificada a coloração das colônias de cada isolado nos três meios de cultura. A avaliação foi feita partir da observação da cor do micélio e do reverso da colônia (centro e borda) aos 20 dias nos três meios de cultura BDA, SN, AM com a utilização de uma escala padrão de cores (Pantone®). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com repetições de quatro placas por isolado em cada meio.

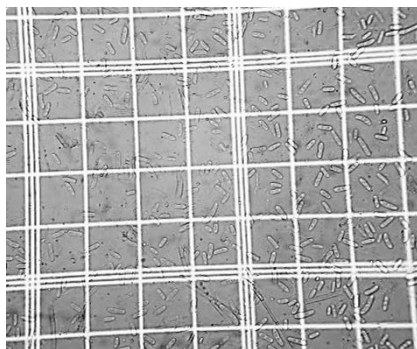
3.2.5 Quantidade de conídios

Para avaliação da quantidade de conídios produzidos em cada meio de cultura, foram utilizadas as placas do ensaio de crescimento micelial.

Um esporodóquio de cada isolado dos meios de cultura foi macerado em almofariz com bastão de porcelana em 1 mL de ADE. Essa suspensão foi suplementada com Tween 80 e agitada manualmente. A leitura da quantidade de conídios foi feita pela retirada de uma amostra da suspensão e avaliada em câmara de Neubauer em microscópio óptico pela contagem dos conídios nos cinco quadrantes centrais e multiplicada por 50.000 (Figura 3).

O delineamento foi inteiramente casualizado e calculado desvio padrão das médias em cada meio de cultura por isolado.

Figura 3 – Câmara de Neubauer para avaliação de conídios.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

3.2.6 Morfologia dos conídios

Da suspensão do teste anterior, também foi retirada amostra para verificar a morfologia dos conídios (micro/macro) produzidos por cada isolado nos meios de cultura. No microscópio utilizou-se uma régua micrométrica e ocular de 20x, onde foi medido o comprimento e a largura de 50 conídios de cada isolado em cada meio de cultura. A conversão para micrômetro (μ) foi pela multiplicação do resultado por 10, de acordo com a calibração do microscópio.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial de 3x35 e com quatro repetições por isolado em cada meio avaliado. Os dados para análise estatística foram transformados em $X=X+C$, onde a constante $C = 0,5$.

3.2.7 Quantidade de conídios em colônias de sete dias

Disco de micélio de 5,0 mm de colônia pura de dez dias de idade foi transferido para placa com meio BDA de cada isolado e foi incubada em BOD a 22°C. Após sete dias de crescimento das colônias, foram raspadas com 5 mL de ADE para formação de suspensão que foi filtrada em gaze esterilizada e suplementada com Tween 80.

Amostras da suspensão foram adicionadas a câmara de Neubauer em microscópio óptico para contagem dos conídios nos cinco campos e multiplicada por 50.000 e verificação do tipo de conídio pela presença ou não de septo.

Ensaio inteiramente casualizado com leitura de quatro amostras por suspensão e calculado desvio padrão das médias de cada isolado.

3.2.8 Germinação de conídios

A avaliação da germinação foi feita com conídios de um isolado de cada localidade, escolhido aleatoriamente, totalizando cinco isolados.

Foram raspadas colônias de dez dias de crescimento em meio BDA com 5 mL de ADE e seus respectivos esporodóquios foram macerados e misturados a suspensão da raspagem da placa que foi filtrada em gaze esterilizada. As suspensões foram suplementadas com Tween 80, agitadas e a concentração dos conídios foi aferida em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

Em 10 mL de caldo malte (CM) contido em pequenos frascos de cor âmbar, foi adicionada uma quantidade de suspensão (S) para obter-se a concentração final de 1×10^5 conídios/mL. Essa suspensão foi chamada de S1. Posteriormente, os frascos com a S1 foram

incubados em BOD a 22°C sem iluminação para melhor germinação dos conídios.

Foram realizadas quatro avaliações a cada oito horas de incubação, totalizando 24 hs, com a retirada de 1 mL da S1 para outro frasco e adicionado 0,01 mL de solução de lactoglicerol para paralisar o crescimento do tubo germinativo, e foi denominada de suspensão final (SF). O delineamento foi inteiramente casualizado, com quatro repetições de 0,1 mL da SF, sendo contados 25 conídios em cada repetição por isolado, com tubo germinativo crescido duas vezes do tamanho do conídio. Na análise estatística, os dados foram inseridos em porcentagem e transformados para $\text{ARCSEN}\sqrt{X/100}$.

3.3 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS *IN VITRO*

Foram utilizadas colônias puras dos isolados FR04, NR02 e NR05, escolhidos aleatoriamente entre os isolados disponíveis. Em metodologia adaptada de Weber e Palm (2010), foi utilizado o meio ágar extrato de malte (AM), onde foram incorporadas doses dos fungicidas (Tabela 2) e vertido nas placas de Petri. O meio ágar malte foi acidificado a 2% para o fungicida fosetil alumínio (Fenn e Coffey, 1984). A concentração em partes por milhão (ppm) dos fungicidas captana, piraclostrobina, tebuconazole, tiofanato metílico foi adaptada de Fischer, Almeida e Garcia, 2006; para o fosfito de potássio foi adaptada de Caixeta, Vieira e Canedo, 2012); e para o fosetil alumínio foi utilizada a concentração descrita por Fenn e Coffey, 1984. Para a testemunha foi utilizado apenas o meio AM.

Discos de AM com fungicida do centro da placa foram substituídos por discos de micélio dos isolados. As placas foram incubadas em BOD, a 22°C com iluminação constante.

Tabela 2 – Fungicidas e concentração em ppm utilizada para eficiência *in vitro*.

| Tratamento | Nome Técnico | Nome Comercial | Concentração em ppm |
|------------|--------------------|------------------|---------------------|
| 1 | Ágar Malte | - | - |
| 2 | Captana | Orthocide 500 | 10 |
| 3 | Piraclostrobina | Comet 250 EC | 10 |
| 4 | Fosetil Al | Aliette | 500 |
| 5 | Fosfito de K | Fitofos Kplus | 10 |
| 6 | Tebuconazole | Alterne | 10 |
| 7 | Tiofanato Metílico | Fungiscan 700 PM | 10 |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

A avaliação ocorreu após sete dias de incubação com a medição das colônias e determinado percentual de inibição (%I) pela fórmula descrita por Fischer, Almeida e Garcia (2006):

$$\%I = \frac{\text{diâmetro da testemunha} - \text{diâmetro do tratamento}}{\text{diâmetro da testemunha}} \times 100$$

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de uma placa, e os dados foram transformados para $\text{ARCSEN}\sqrt{X/100}$.

3.4 AGRESSIVIDADE DOS ISOLADOS EM FRUTOS

Frutos sadios das cultivares Gala e Fuji foram desinfestados com hipoclorito de sódio e álcool 92° e enxaguados com água destilada (AD). A secagem foi feita com papel toalha. Na parte superior dos frutos foram feitas perfurações de 5,0 mm (Figura 4). A

inoculação dos frutos foi adaptada de Takahaki (2008), realizada com disco de micélio de 5,0 mm, extraído da borda de colônias monospóricas dos 35 isolados de *N. ditissima* com o auxílio de um perfurador e transferido para os ferimentos nos frutos. Os pontos de inoculação foram fixados com fita adesiva. Após, os frutos foram acondicionados em câmara úmida em bandejas, cobertas com saco plástico e mantidas em câmara de luz com temperatura de 22°C.

Figura 4 – Ferimentos tipo perfurações de 5,0 mm realizados nos frutos de maçã da cv. Gala.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

As avaliações foram com sete e 14 dias, através da medição do diâmetro das lesões com um paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de um fruto com quatro ferimentos inoculados por isolado.

3.5 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS UTILIZADOS ISOLADOS E EM MISTURA EM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS

3.5.1 Fungicidas utilizados isoladamente

Mudas de macieira da cultivar Gala com três anos de idade, sofreram ferimento de 5,0 mm com bisturi pela retirada de uma gema. As mudas foram tratadas por aspersão, até escorrimento da calda, com os fungicidas na dose do produto comercial de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3 – Fungicidas utilizados isoladamente nos tratamentos de mudas de macieira cv. Gala em sala climatizada.

| Tratamento | Nome Técnico | Nome Comercial | Dose / 100L |
|------------|-----------------------------|------------------|-------------|
| 1 | Captana | Orthocide 500 | 240 g |
| 2 | Tebuconazole | Alterne | 40 ml |
| 3 | Tiofanato metílico | Fungiscan 700 PM | 70 g |
| 4 | Piraclostrobina | Comet 250 EC | 40 ml |
| 5 | Fosfito de K | Fitofos Kplus | 200 ml |
| 6 | Fosetil-Al | Aliette | 250 g |
| 7 | Testemunha tratada com água | - | - |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Após 24 hs do tratamento, as mudas foram inoculadas nos ferimentos com disco de micélio de 5,0 mm de colônias de *N. ditissima* (NR02) crescidas em BDA durante 15 dias através de metodologia descrita por Muniz (2004) (Figura 5). Os pontos de inoculação foram protegidos com fita adesiva. A testemunha recebeu tratamento com água destilada. As mudas foram

plantadas em floreiras de 100 x 20 x 20 cm e mantidas em câmara úmida com fotoperíodo de 12 hs de luz, a temperatura de 22°C (Figura 5).

Figura 5 – Inoculação em ferimento de mudas de macieira cv. Gala com disco de micélio de 5,0 mm de *Neonectria ditissima* crescido em BDA (A). Floreiras com mudas de macieira da cv. Gala, utilizadas na sala de crescimento climatizada (B).



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

A avaliação foi realizada aos sete e 14 dias após a inoculação dos discos de micélio, medindo-se as lesões com auxílio de paquímetro digital. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com quatro repetições de uma planta com cinco ferimentos, totalizando 20 ferimentos por tratamento. O ensaio foi repetido duas vezes.

3.6.2 Fungicidas utilizados em mistura

Mudas de macieira da cultivar Gala com três anos de idade foram tratadas com mistura de fungicidas na dose do produto comercial de acordo com a Tabela 4, pelo método de imersão da parte aérea (método utilizado

para tratamento de mudas em viveiros) previamente ao plantio em diferentes períodos de imersão: 15 minutos e 60 minutos (Figura 6). Após 24 hs da imersão das mudas na calda, foram inoculadas pelo mesmo método de disco de micélio que o ensaio anterior, porém pela mistura dos isolados FR04, NR02 e NR05 (colônias crescidas de suspensão feita pela raspagem e mistura dos três isolados). Nesse ensaio foi incluída testemunha não inoculada.

Tabela 4 – Fungicidas utilizados em mistura nos tratamentos de mudas de macieira cv. Gala plantadas a campo.

| Tratamento | Nome Técnico | Nome Comercial | Dose / 100L |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | Captana | Orthocide 500 | 240 g |
| | Tiofanato metílico | Fungiscan 700 PM | 70 g |
| | Fosfito de K | Fitofos Kplus | 200 ml |
| 2 | Tebuconazole | Alterne | 40 ml |
| | Tiofanato metílico | Fungiscan 700 PM | 70 g |
| | Fosfito de K | Fitofos Kplus | 200 ml |
| 3 | Fosetil-Al | Aliette | 250 g |
| | Tiofanato metílico | Fungiscan 700 PM | 70 g |
| | Fosfito de K | Fitofos Kplus | 200 ml |
| 4 | Piraclostrobina | Comet | 40 ml |
| | Tiofanato metílico | Fungiscan 700 PM | 70 ml |
| | Fosfito de K | Fitofos Kplus | 200 ml |
| 5 | Testemunha tratada com água | - | - |
| 6 | Testemunha não inoculada | - | - |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

As mudas foram incubadas por 72 hs em câmara úmida, com temperatura de 22°C e sem iluminação. Decorridas às 72 hs, as mudas foram plantadas a campo com espaçamento de 30 cm entre plantas e 300 cm entre linhas (Figura 6). As avaliações foram com base no início do aparecimento dos sintomas (IAS) no tecido vegetal e repetidas com intervalos de 15 dias com registro do tamanho das lesões.

Figura 6 – Tratamento por imersão de mudas de macieira cv. Gala por 15 e 60 minutos em calda de mistura de fungicidas (A) e plantio a campo das mudas após tratamento e inoculação com *Neonectria ditissima*.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Os experimentos foram conduzidos em delineamento experimental inteiramente casualizado, com quatro repetições de duas plantas com três ferimentos para cada tratamento, totalizando 24 ferimentos nas quatro repetições.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos experimentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e quando significativas, as médias foram analisadas pelo teste de Scott-Knock, no programa ASSISTAT 7.7 Beta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

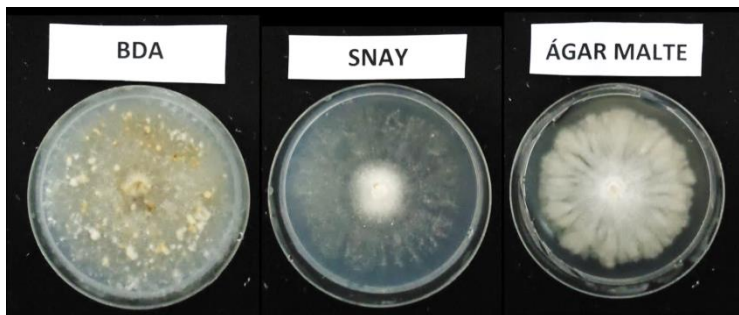
4.1 CARACTERIZAÇÃO MORFO-FISIOLÓGICA DOS ISOLADOS

4.1.1 Crescimento micelial médio dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em três meios de cultura

Houve diferença significativa no crescimento micelial de *N. ditissima* entre os meios de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), SN (SNAY) e AM (ágar extrato de malte) (Figura 7).

Dos 35 isolados, sete tiveram crescimento micelial médio (CMM) acima do diâmetro de 60,0 mm no meio BDA, três no meio SN e dois no meio AM após 20 dias de incubação (Tabela 5).

Figura 7 – Colônias do isolado FROL 08 de *Neonectria ditissima* nos meios BDA (batata-dextrose-ágar), SN (SNAY) e AM (ágar extrato de malte) após 20 dias de incubação.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 5 – Crescimento micelial médio de 35 isolados de *Neonectria ditissima* de cinco pomares de macieira dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em três meios de cultura, após 20 dias de incubação a 22°C. (Continua...)

| Isolado | CMM (mm) | | |
|---------|----------------|----------------|----------------|
| | BDA | SN | AM |
| NR02 | <u>60,32</u> b | <u>63,94</u> a | 39,75 m |
| NR03 | <u>67,89</u> a | 59,13 c | 59,20 c |
| NR05 | <u>62,68</u> b | 43,73 j | 38,79 m |
| NR10 | <u>61,08</u> b | 52,54 f | 50,16 g |
| FR04 | <u>60,32</u> b | 48,40 h | 52,58 f |
| FR10 | 44,63 j | 54,40 e | 49,83 g |
| FR14 | 56,90 d | 49,19 g | 41,64 l |
| FR15 | 46,53 i | 54,30 e | 46,12 i |
| CPi01 | 46,21 i | 55,29 d | 58,46 c |
| CPi02 | 59,76 c | <u>61,97</u> b | 57,06 d |
| CPi03 | 36,63 n | 38,14 n | 39,89 m |
| CPi05 | 32,23 p | 49,45 g | 49,11 g |
| CPi06 | 37,14 n | 39,02 m | <u>62,08</u> b |
| CPi09 | 58,61 c | 37,80 n | 56,35 d |
| CPi10 | 35,28 o | 34,92 o | 49,49 g |
| CPi14 | <u>64,35</u> a | 48,52 h | 58,04 c |
| CPi16 | 41,44 l | 49,93 g | 55,47 d |
| CPi17 | 37,83 n | 56,96 d | <u>61,36</u> b |
| AD03 | 50,32 g | 32,15 p | 36,42 n |
| AD04 | 34,26 o | 46,79 i | 29,69 p |
| AD05 | 53,30 e | 42,36 l | 39,15 m |
| AD06 | 44,75 j | 47,55 h | 32,44 p |
| AD07 | 54,35 e | 41,63 l | 39,59 m |
| AD08 | 47,44 h | 48,65 h | 38,15 n |
| AD10 | 51,62 f | 37,81 n | 33,94 o |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 5 – Crescimento micelial médio de 35 isolados de *Neonectria ditissima* de cinco pomares de macieira dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em três meios de cultura, após 20 dias de incubação a 22°C. (Conclusão)

| Isolado | CMM (mm) | | |
|---------|----------------|----------------|---------|
| | BDA | SN | AM |
| FROL01 | 52,82 f | 41,18 l | 37,24 n |
| FROL02 | 55,25 d | 43,58 j | 38,37 m |
| FROL03 | 53,13 e | 40,84 l | 38,01 n |
| FROL04 | 55,76 d | 34,55 o | 34,41 o |
| FROL05 | 59,38 c | 51,24 f | 44,43 j |
| FROL06 | 56,81 d | 38,73 m | 36,75 n |
| FROL07 | 54,11 e | 47,48 h | 42,04 l |
| FROL08 | <u>62,02 b</u> | <u>61,56 b</u> | 48,26 h |
| FROL09 | 58,84 c | 59,22 c | 48,23 h |
| FROL10 | 57,63 c | 55,47 d | 48,28 h |
| Média | 51,76 | 47,67 | 45,45 |
| CV % | | 2,71 | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Os isolados foram separados em grupos de acordo com o crescimento micelial médio no meio de cultura BDA. O meio BDA foi selecionado por proporcionar maior tamanho de colônia entre os meios avaliados para a maioria dos isolados. Foram identificados três grupos com diferentes diâmetros e organizados por ordem crescente de acordo com o CMM (Tabela 6). No Grupo 1, formado por seis isolados, ficaram os de crescimento médio de 35,56 mm. O Grupo 2 com 22 isolados, tiveram crescimento médio entre 40,00 a 59,99 mm, com média de 52,71 mm. O Grupo 3, formado por sete isolados, tiveram o crescimento médio de 62,67 mm. O menor diâmetro de colônia observado foi do isolado CPi05 com

32,23 mm, e o maior diâmetro foi verificado no NR03, com 67,89 mm.

Tabela 6 – Grupos formados pelos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em ordem crescente de crescimento micelial médio (mm). (Continua...)

| Grupo Tamanho | Isolado | CMM | Média do grupo |
|----------------------------------|----------------|------------|---------------------------|
| Grupo 1 20,00-39,99 mm | CPi05 | 32,23 p | 35,56 |
| | AD04 | 34,26 o | |
| | CPi10 | 35,28 o | |
| | CPi03 | 36,63 n | |
| | CPi06 | 37,14 n | |
| | CPi17 | 37,83 n | |
| Grupo 2 40,00-59,99 mm | CPi16 | 41,44 l | 52,71 |
| | FR10 | 44,63 j | |
| | AD06 | 44,75 j | |
| | CPi01 | 46,21 i | |
| | FR15 | 46,53 i | |
| | AD08 | 47,44 h | |
| | AD03 | 50,32 g | |
| | AD10 | 51,62 f | |
| | FROL01 | 52,82 f | |
| | FROL03 | 53,13 e | |
| | AD05 | 53,30 e | |
| | FROL07 | 54,11 e | |
| | AD07 | 54,35 e | |
| | FROL02 | 55,25 d | |
| | FROL04 | 55,76 d | |
| | FROL06 | 56,81 d | |
| | FR14 | 56,90 d | |
| | FROL10 | 57,63 c | |
| | CPi09 | 58,61 c | |
| | FROL09 | 58,84 c | |
| FROL05 | 59,38 c | | |
| CPi02 | 59,76 c | | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 6 – Grupos formados pelos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em ordem crescente de crescimento micelial médio (mm). (Conclusão)

| Grupo Tamanho | Isolado | CMM | Média do grupo |
|------------------------------|----------------|------------|---------------------------|
| Grupo 3 > 60,00 mm | FR04 | 60,32 b | 62,67 |
| | NR02 | 60,32 b | |
| | NR10 | 61,08 b | |
| | FROL08 | 62,02 b | |
| | NR05 | 62,68 b | |
| | CPi14 | 64,35 a | |
| | NR03 | 67,89 a | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado com base na primeira avaliação de crescimento em relação à última, num total de quatro avaliações. Foram observadas as maiores velocidades de crescimento (> 4,00 mm) em meio BDA com sete isolados, seguido pelo meio SN com quatro isolados e no meio AM não foi observado índice maior de 4,00 mm (Tabela 7).

As maiores velocidades de crescimento não ficaram restritas a isolados de um mesmo pomar, ocorrendo diferentes índices entre todos os isolados nos meios. No fatorial de interação do meio de cultura BDA, foram observados IVCM acima 4,0 mm nos isolados NR02, NR03, NR10, FR04, AD07, FROL08 e FROL09.

Ainda, dois isolados de cada grupo de crescimento micelial, foram escolhidos pelo maior e menor tamanho de colônia nos grupos e enviados para análise molecular em laboratório credenciado pelo MAPA, onde se confirmou ser o patógeno *Neonectria ditissima*.

Tabela 7 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* provenientes de cinco pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC após 20 dias de incubação. (Continua...)

| Isolado | IVCM (mm) | | |
|---------|----------------|----------------|---------|
| | BDA | SN | AM |
| NR02 | <u>4,06 cB</u> | <u>4,29 bA</u> | 2,39 iC |
| NR03 | <u>4,61 aA</u> | 3,84 dB | 3,89 aB |
| NR05 | 3,95 dA | 2,53 iB | 2,25 iC |
| NR10 | <u>4,30 bA</u> | 3,88 dB | 3,53 dC |
| FR04 | <u>4,09 cA</u> | 3,02 gC | 3,40 eB |
| FR10 | 2,97 iC | 3,77 dA | 3,20 fB |
| FR14 | 3,64 eA | 3,08 gB | 2,43 iC |
| FR15 | 3,09 hB | 3,70 dA | 3,10 gB |
| CPi01 | 3,09 hA | 1,68 mC | 2,06 jB |
| CPi02 | 2,22 iB | 3,24 fA | 1,81 iC |
| CPi03 | 3,32 gA | 2,43 iB | 2,29 iB |
| CPi05 | 3,12 hB | 3,33 fA | 2,04 jC |
| CPi06 | 3,41 fA | 2,49 iB | 2,33 iC |
| CPi09 | 3,27 gA | 3,37 fA | 2,49 hB |
| CPi10 | 3,21 gA | 2,14 iB | 1,94 iC |
| CPi14 | 2,82 iC | 3,41 eB | 3,73 bA |
| CPi16 | 3,95 dB | <u>4,55 aA</u> | 3,62 cC |
| CPi17 | 2,10 mB | 2,31 jA | 2,30 iA |
| AD03 | 2,06 mC | 2,91 hB | 3,07 gA |
| AD04 | 2,25 iC | 2,45 iB | 3,94 aA |
| AD05 | 3,71 eA | 2,36 jC | 3,45 dB |
| AD06 | 2,28 iB | 2,25 jB | 3,01 gA |
| AD07 | <u>4,16 cA</u> | 2,91 hC | 3,65 cB |
| AD08 | 2,48 jC | 2,88 hB | 3,46 dA |
| AD10 | 2,33 iC | 3,50 eB | 3,87 aA |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 7 – Índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* provenientes de cinco pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC após 20 dias de incubação. (Conclusão)

| Isolado | IVCM (mm) | | |
|---------|----------------|----------------|---------|
| | BDA | SN | AM |
| FROL01 | 3,40 fA | 2,43 iB | 2,21 jC |
| FROL02 | 3,44 fA | 2,49 iB | 2,15 jC |
| FROL03 | 3,44 fA | 2,52 iB | 2,26 iC |
| FROL04 | 3,62 eA | 1,98 lB | 2,07 jB |
| FROL05 | 3,74 eA | 3,07 gB | 2,67 hC |
| FROL06 | 3,60 eA | 2,18 lB | 2,15 jB |
| FROL07 | 3,44 fA | 2,96 hB | 2,55 hC |
| FROL08 | <u>4,19 cA</u> | <u>4,16 bA</u> | 3,07 gB |
| FROL09 | <u>4,04 cA</u> | <u>4,02 cA</u> | 3,22 fB |
| FROL10 | 3,91 dA | 3,71 dB | 3,09 gC |
| Média | 3,35 | 3,02 | 2,82 |
| CV % | | 3,5 | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Estudos de crescimento micelial são realizados com fungos de várias espécies para determinação de comportamento em diferentes substratos. Silva e Teixeira (2012) mostram que o fungo *Fusarium solani* tem maior crescimento micelial em meio BDA, proporcionando maior velocidade de crescimento em regime de luz contínua.

A composição do meio de cultura mostra adequação às demandas fisiológicas do patógeno, determinando a melhor quantidade e qualidade do crescimento micelial e esporulação (CARNAÚBA et al., 2007). O meio BDA possui mais nutriente e quantidade de carboidratos para desenvolvimento das colônias (STRANDBERG, 1987).

Ainda, Bogo et al. (2008) observaram maior crescimento de *Cryptosporiopsis perennans* em meio V8

e Agar extrato de malte (AEM) devido a alta concentração de extratos vegetais e carboidratos. Entretanto, nesse trabalho, o meio AM (=AEM) não proporcionou grande crescimento das colônias de *N. ditissima*.

Lolas (2001) utilizou o meio SNAY para maior produção de esporos de *N. galligena* e Langrell (2002) para crescimento de cepas de *Fusarium lateritium*.

4.1.2 Formação de estruturas reprodutivas dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em três meios de cultura

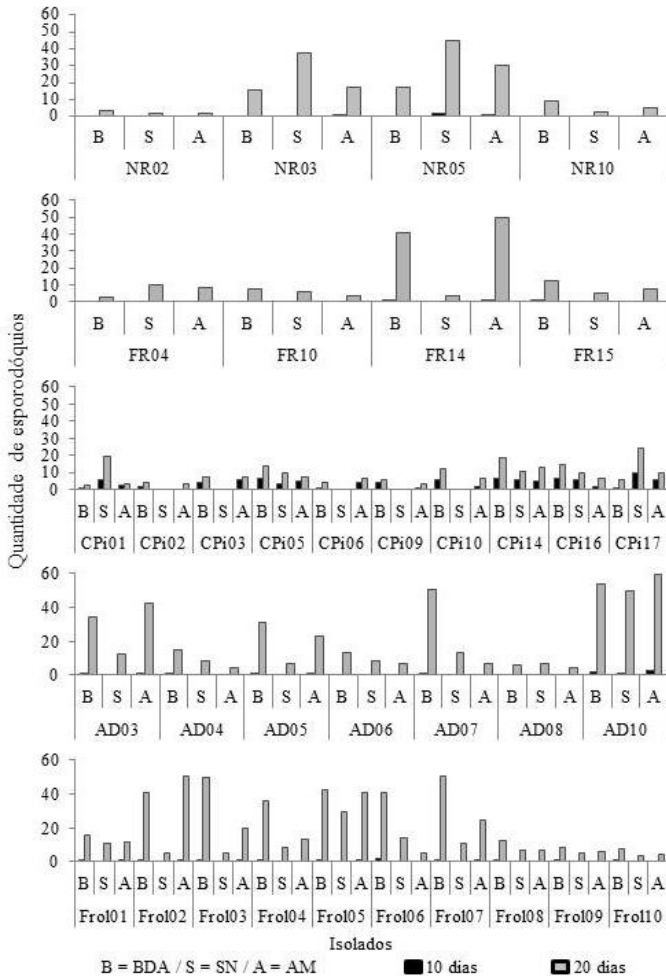
Em meio BDA, a formação de estruturas reprodutivas tipo esporodóquio foi verificada em 27 isolados, onde produziram pelo menos um esporodóquio por cm^2 aos 10 dias de incubação (Figura 8). Aos 20 dias todos os isolados produziram um esporodóquio por cm^2 , sendo a maior média de 53,75 esporodóquios no isolado AD10 e a menor média de 2,75 esporodóquios nos isolados FR04 e CPi01 (Figura 8). Os esporodóquios produzidos eram arredondados, aveludados de coloração amarelo à marrom claro (Figura 9A).

No meio SN, sete isolados produziram esporodóquios por cm^2 nos dez dias de incubação (Figura 8). Aos 20 dias, 30 isolados apresentavam a estrutura com médias de 1,75 esporodóquios no isolado NR02 a 49,75 esporodóquios no AD10 (Figura 8). O formato dos esporodóquios no meio SN eram indefinidos e aéreos, formados pelo emaranhado de micélios na parte mais superior das colônias e de coloração branca (Figura 9B).

Em meio de cultura AM, 20 os isolados produziram esporodóquios por cm^2 em dez dias de incubação (Figura 8). Aos 20 dias, todos os isolados tinham a estrutura na colônia em médias de 1,75 esporodóquios no isolado NR02 e 59,00 esporodóquios

no AD10 (Figura 8). Os esporódios tinham coloração amarelo claro com formato arredondado e aveludados (Figura 9C).

Figura 8 – Quantidade de esporódios por cm^2 de *Neonectria ditissima* nos cinco grupos de isolados de pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC com dez e 20 dias de incubação.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Figura 9 – Cor e formato dos esporodóquios de *Neonectria ditissima* nos meios BDA (A), SN (B) e AM (C).



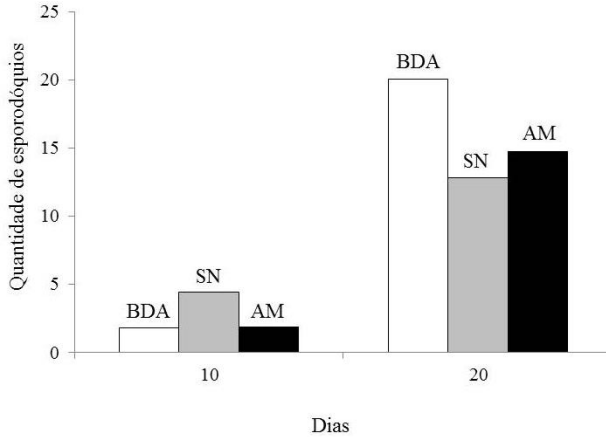
Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Assim como no crescimento das colônias, a interação da composição do meio de cultura influencia na formação das estruturas reprodutivas. O isolado AD10 produziu maior número de esporodóquios nos três diferentes meios.

A média geral (Figura 10) mostra que o meio de cultura SN proporciona maior produção de esporodóquios em dez dias de incubação. Contudo, aos 20 dias de incubação, o maior número de esporodóquios é conseguido no meio BDA.

Zeller (1926) relata que esporodóquios podem chegar até 3 mm de diâmetro e, quando observados em meios com glicose e ágar, são formados por hifas entrelaçadas e frouxas. Ainda, menciona que podem não ser de forma globular, como verificado no meio SN.

Figura 10 – Média geral da quantidade de esporodóquios por cm² de *Neonectria ditissima* em três meios de cultura avaliados aos dez e 20 dias dos 35 isolados de pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Em estudo com meios agarizados, Amponsah, Walter e Scheper (2014) observaram numerosos esporodóquios em meio ágar água alterado com seiva de brotos de maçã. O mesmo foi verificado no ensaio com o meio ágar malte, obtendo maior número da estrutura reprodutiva.

4.1.3 Coloração das colônias de *Neonectria ditissima* em três meios de cultura

A observação da coloração das colônias e pigmentação no meio variou nos três meios de cultura (Tabela 8). As cores das colônias no meio BDA variaram de branca, tons de bege e laranja, com bordas ausentes ou presentes em bege claro e branca.

Tabela 8 – Coloração das colônias e pigmentação do meio dos três meios de cultura dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* após 20 dias de incubação. (Continua...)

| Isolado | Meio de cultura | Cor da colônia | Borda (coloração) | Pigmentação do meio |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------|
| NR02 | BDA | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| NR03 | BDA | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| NR05 | BDA | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo claro |
| NR10 | BDA | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| FR04 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| FR10 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| FR14 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Bege claro | Ausente | Bege |
| FR15 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 8 – Coloração das colônias e pigmentação do meio dos três meios de cultura dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* após 20 dias de incubação. (Continuação...)

| Isolado | Meio de cultura | Cor da colônia | Borda (coloração) | Pigmentação do meio |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|---|
| CPi01 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Bege |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Bege claro | Ausente | |
| CPi02 | BDA | Branco | Ausente | Amarelo médio Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| CPi03 | BDA | Bege claro | Ausente | Bege Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| CPi05 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Bege |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Bege claro | Ausente | |
| CPi06 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| CPi09 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| CPi10 | BDA | Branco | Ausente | Bege Branco Bege |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Bege claro | Ausente | |
| CPi14 | BDA | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas Branco Bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| CPi16 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| CPi17 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 8 – Coloração das colônias e pigmentação do meio dos três meios de cultura dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* após 20 dias de incubação. (Continuação...)

| Isolado | Meio de cultura | Cor da colônia | Borda (coloração) | Pigmentação do meio |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------|
| AD03 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Bege claro |
| AD04 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| AD05 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| AD06 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Branco | Ausente | Amarelo médio |
| AD07 | BDA | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Bege claro | Ausente | Amarelo médio |
| AD08 | BDA | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Bege claro | Ausente | Amarelo médio |
| AD10 | BDA | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Bege claro | Ausente | Amarelo médio |
| FROL01 | BDA | Branco | Ausente | Bege |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Bege claro | Ausente | Bege |
| FROL02 | BDA | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas |
| | SN | Branco | Ausente | Branco |
| | AM | Bege claro | Ausente | Bege |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

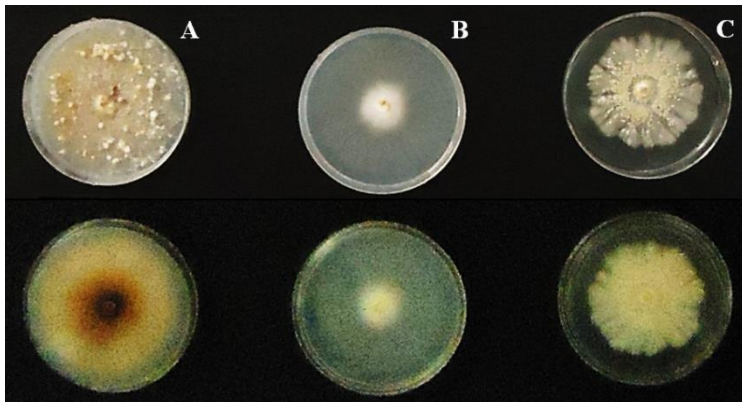
Tabela 8 – Coloração das colônias e pigmentação do meio dos três meios de cultura dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* após 20 dias de incubação. (Conclusão)

| Isolado | Meio de cultura | Cor da colônia | Borda (coloração) | Pigmentação do meio |
|----------------|------------------------|-----------------------|--------------------------|---|
| FROL03 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo claro |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| FROL04 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Bege |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Bege claro | Ausente | |
| FROL05 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo claro |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| FROL06 | BDA | Branco | Ausente | Bege claro Branco Bege |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Bege claro | Ausente | |
| FROL07 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Bege |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Bege claro | Ausente | |
| FROL08 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo claro |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| FROL09 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |
| FROL10 | BDA | Bege | Bege claro | Marrom com bordas bege claro Branco Amarelo médio |
| | SN | Branco | Ausente | |
| | AM | Branco | Ausente | |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

A pigmentação do meio BDA variou de tons de amarelo, marrom com bordas bege, tons de bege e laranja com bordas brancas (Figura 11A). As colônias no meio SN apresentaram coloração e pigmentação branca a transparente (Figura 11B). Em AM, as colônias variaram da cor branca a bege claro, com borda ausente e pigmentação em tons de amarelo, tons de bege e branca (Figura 11C).

Figura 11 – Coloração característica das colônias de *Neonectria ditissima* e pigmentação em meio BDA (A), SN (B) e AM (C).



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Conforme a escala de cores Pantone® formou-se grupos pela cor característica no meio BDA de cada isolado de *N. ditissima* (Tabela 9). Alguns isolados diferiram dos Grupos 1, 2 e 3 do ensaio de crescimento micelial médio (CMM). Dos 22 isolados do Grupo 2, maior grupo de CMM, 15 fizeram parte do Grupo B de coloração, com colônias em tons de bege e pigmentação do meio em marrom com bordas em tons de bege.

Tabela 9 – Grupos dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em meio BDA agrupados de acordo com a coloração das colônias e pigmentação do meio após 20 dias de incubação.

| Grupos | Isolados | Cor da colônia | Borda | Pigmentação do meio |
|--------|---|-----------------------|--------------|-----------------------------------|
| A | NR02, NR03, NR10 e CPi02 | Branco | Ausente | Tons de amarelo |
| B | FR04, FR10, FR14, FR15, CPi01, CPi05, CPi06, CPi09, Cpi16, Cpi17, AD03, AD04, AD06, FROL03, FROL04, FROL05, FROL07, FROL08, FROL09 e FROL10 | Tons de bege | Tons de bege | Marrom com bordas em tons de bege |
| C | CPi03, CPi10, FROL01 e FROL06 | Branco e tons de bege | Ausente | Tons de bege |
| D | NR05, CPi14, AD07, AD08, AD10 e FROL02 | Laranja claro | Branco | Laranja com bordas brancas |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Zeller (1926) relata que o micélio pode ser branco, tons de amarelo e marrom e de cor creme (amarelo claro). Em pesquisa realizada com os gêneros *Neonectria* e *Cylindrocarpon*, Brayford et al. (2004) menciona que as colônias de *N. fuckeliana* em meio Batata-Sacarose-Ágar, pigmentam o meio em tom de marrom claro com bordas brancas e micélio aéreo e em meio SNAY, não ocorre pigmentação (hialino).

Em outras pesquisas relata-se que o meio de cultura utilizado pode influenciar na diversidade de

coloração do micélio de fitopatógenos (POLONI et al., 2008; BOGO et al., 2008; CASTRO, 2007).

Também, Andrade et al. (2007) estudando a morfologia de *Colletotrichum gloeosporioides*, verificaram a formação de grupos de acordo com a coloração das colônias em meio BDA, ocorrendo sete grupos deste fungo. Os 35 isolados de *N. ditissima* usados no ensaio formaram quatro grupos distintos com base nas características de coloração e pigmentação do meio BDA.

4.1.4 Quantidade de conídios de *Neonectria ditissima* em um esporóquio nos três meios de cultura e em colônias cultivadas em meio BDA com sete dias de idade

Houve variação na quantidade de conídios por isolado de *N. ditissima* em cada meio de cultura. De acordo com a produção média (Figura 12), o meio SN foi o que produziu mais conídios.

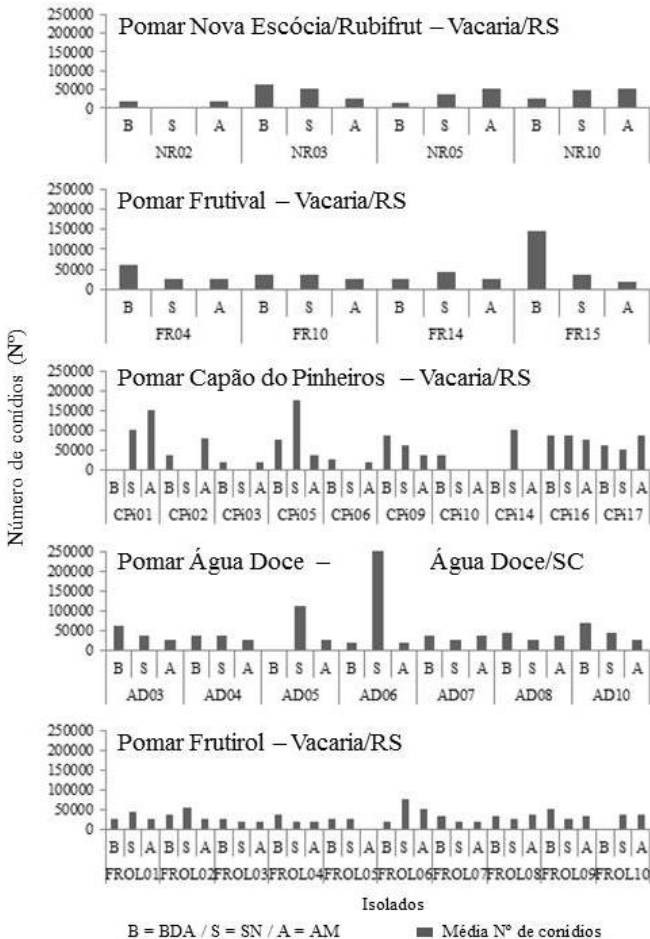
A quantidade de conídios nos isolados CPi05, CPi14, AD06, FROL02 e FROL06 foi significativa no meio de cultura SN em relação aos outros dois meios. Os isolados FR15, FROL04, FROL07 e FROL09 em meio BDA foram os que produziram mais conídios e os isolados NR05, NR10, CPi01, CPi02, CPi16, CPi17, FROL06, FROL08, FROL09 e FROL10 no meio de cultura AM se destacaram na produção de conídios.

Ainda, nove isolados não produziram conídios em pelo menos um dos meios de cultura avaliados.

Na avaliação da produção de conídios em colônias cultivadas em meio BDA com sete dias de idade, 22 isolados produziram conídios, sendo que o FROL01 foi o isolado que se destacou com mais de 120 mil conídios (Figura 13). Dos isolados que produziram conídios, seis tinham macro e microconídios e o restante

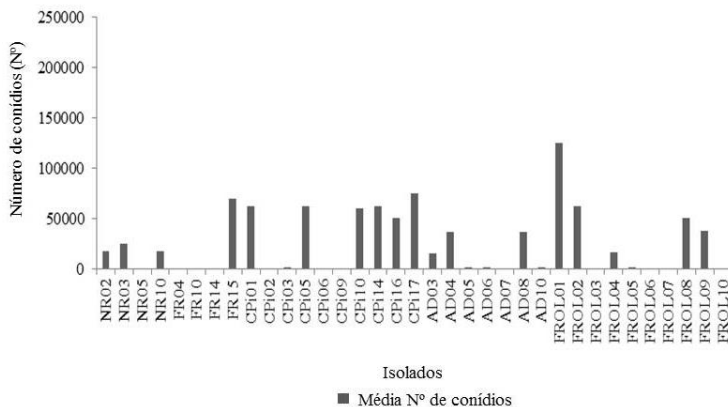
apenas microconídios (Tabela 10). O diâmetro médio das colônias avaliadas foi de 26 mm.

Figura 12 – Produção média de conídios dos isolados de *Neonectria ditissima* dos pomares dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em um esporodóquio de 20 dias de idade cultivado nos meios de cultura BDA, SN e AM.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Figura 13 – Produção média de conídios dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* em colônias cultivadas em meio BDA com sete dias de idade.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 10 – Tipo de conídio produzido nas colônias dos isolados de *Neonectria ditissima* em meio BDA com sete dias de idade.

| Tipo de conídio | Isolados |
|------------------------|---|
| Macro | - |
| Micro | NR03, NR10, CPi01, CPi03, CPi05, CPi10, CPi14, CPi16, CPi17, AD03, AD06, AD08, AD10, FROL02, FROL05, FROL08 |
| Macro/Micro | NR02, FR15, AD04, FROL01, FROL04, FROL09 |
| Não produziram | NR05, FR04, FR10, FR14, CPi02, CPi06, CPi09, AD05, AD07, FROL03, FROL06, FROL07, FROL10 |

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Amponsah, Walter e Scheper (2014) avaliaram a produção de conídios viáveis de *N. ditissima* em meios preparados com ágar. Como resultados, mostraram a viabilidade de produção de unidades infectivas nos meios preparados com ágar para produção de inóculo, sendo que a patogenicidade é semelhante aos conídios obtidos em campo.

Em estudo do efeito do meio de cultura, Scheper et al. (2014) conseguiram alta esporulação dos isolados de *N. ditissima*, produzindo macro e microconídios em mais de 71% dos isolados utilizados no experimento. Os resultados obtidos nesse estudo são semelhantes ao tipo de conídios de *N. ditissima* conseguidos no meio de cultura BDA.

4.1.5 Morfologia dos conídios de *Neonectria ditissima* nos meios de cultura BDA, SN e AM

A morfologia dos conídios dos 35 isolados de *N. ditissima* foi avaliada quanto ao tipo de conídios produzidos em colônias e esporodóquios de 20 dias de idade nos meios BDA, SN e AM. A caracterização de micro e macroconídio foi através da presença de septo, o qual é visualizado nos macroconídios. Dos 35 isolados, 23 produziram microconídios no meio BDA, 21 no meio SN e 20 produziram microconídios no meio AM (Tabela 11).

Os macroconídios foram encontrados em 12 isolados no meio BDA, 13 no meio SN e 14 no meio de cultura AM (Tabela 12). Ainda, 12 isolados produziram os microconídios nos três meios de cultura e cinco produziram os macroconídios nos três meios avaliados (Tabela 11 e 12).

Tabela 11 – Comprimento e largura de microconídios dos isolados de *Neonectria ditissima* produzidos em colônias de 20 dias de idade nos meios de cultura BDA, SN e AM. (Continua...)

| Isolado | Comprimento microconídio | | | Largura microconídio | | |
|---------|--------------------------|----------|----------|----------------------|---------|---------|
| | BDA | SN | AM | BDA | SN | AM |
| NR02 | 32,10 eA | - | - | 4,82 eA | - | - |
| NR03 | 33,00 eA | 33,20 eA | 32,80 fA | 5,00 dA | 5,04 eA | 4,96 dA |
| NR05 | 36,20 cA | - | - | 5,42 cA | - | - |
| NR10 | - | 33,16 eA | - | - | 4,86 eA | - |
| FR04 | 36,62 cA | 30,50 fC | 32,36 fB | 4,90 dA | 4,50 fB | 4,50 eB |
| FR10 | 31,76 eA | 32,30 eA | 30,90 fA | 4,68 eA | 4,50 fA | 4,54 eA |
| FR14 | 32,63 eA | - | - | 5,14 dA | - | - |
| FR15 | 30,50 eA | 31,50 fA | 31,13 fA | 4,50 eA | 4,50 fA | 4,50 eA |
| CPi01 | - | 36,10 dA | 37,10 cA | - | 5,96 cA | 5,21 cB |
| CPi02 | - | - | - | - | - | - |
| CPi03 | 39,16 bB | - | 41,36 bA | 5,50 cB | - | 5,90 aA |
| CPi05 | 36,30 cA | 33,60 eB | 34,25 eB | 5,50 cA | 5,12 dB | 5,25 cB |
| CPi06 | - | - | 36,13 dA | - | - | 5,50 bA |
| CPi09 | 39,96 bA | 37,50 cB | - | 5,50 cA | 5,70 cA | - |
| CPi10 | 33,63 dA | - | - | 5,12 dA | - | - |
| CPi14 | - | 36,86 cA | - | - | 5,40 dA | - |
| CPi16 | 39,80 bB | 32,63 eC | 42,36 aA | 5,50 cB | 4,92 eC | 6,05 aA |
| CPi17 | 36,90 cA | 34,50 dB | 38,10 cA | 5,18 dB | 5,30 dB | 5,66 bA |
| AD03 | 37,33 cA | - | 37,96 cA | 6,06 bA | - | 5,74 bB |
| AD04 | 32,23 eB | 37,13 cA | 36,26 dA | 4,61 eB | 5,70 cA | 5,54 bA |
| AD05 | - | - | - | - | - | - |
| AD06 | 31,50 eA | 30,50 fA | 31,83 fA | 4,50 eA | 4,50 fA | 4,60 eA |
| AD07 | 41,50 aA | - | - | 6,86 aA | - | - |
| AD08 | 34,90 dA | 35,50 dA | 31,23 fB | 5,18 dA | 4,64 fB | 4,50 eB |
| AD10 | 42,54 aA | - | - | 6,02 bA | - | - |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 11 – Comprimento e largura de microconídios dos isolados de *Neonectria ditissima* produzidos em colônias de 20 dias de idade nos meios de cultura BDA, SN e AM. (Conclusão)

| Isolado | Comprimento microconídio | | | Largura microconídio | | |
|---------|--------------------------|----------|----------|----------------------|---------|---------|
| | BDA | SN | AM | BDA | SN | AM |
| FROL01 | - | 42,12 bA | 31,96 fB | - | 6,64 bA | 4,79 dB |
| FROL02 | 40,83 aB | 45,50 aA | - | 5,62 cB | 6,50 bA | - |
| FROL03 | - | 44,28 aA | 40,36 bB | - | 6,89 aA | 5,68 bB |
| FROL04 | 34,26 dA | 35,46 dA | 35,56 dA | 5,08 dA | 5,17 dA | 5,23 cA |
| FROL05 | - | - | - | - | - | - |
| FROL06 | - | - | - | - | - | - |
| FROL07 | 32,60 eA | 30,50 fB | 32,50 fA | 4,92 dA | 4,50 fB | 5,19 cA |
| FROL08 | 39,13 bA | 35,00 dB | - | 5,82 bA | 4,68 fB | - |
| FROL09 | - | - | 36,25 dA | - | - | 5,65 bA |
| FROL10 | - | 31,90 eA | 32,06 fA | - | 4,56 fA | 4,54 eA |
| CV % | | 3,42 | | | 4,58 | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 12 – Comprimento e largura de macroconídios dos isolados de *Neonectria ditissima* produzidos em colônias de 20 dias de idade nos meios de cultura BDA, SN e AM. (Continua...)

| Isolado | Comprimento macroconídio | | | Largura macroconídio | | |
|---------|--------------------------|----------|----------|----------------------|----------|----------|
| | BDA | SN | AM | BDA | SN | AM |
| NR02 | - | - | 48,30 gA | - | - | 10,06 cA |
| NR03 | - | - | - | - | - | - |
| NR05 | - | 64,70 cA | 62,80 cB | - | 10,78 aA | 10,22 cB |
| NR10 | 62,90 dA | 58,39 eB | 54,70 eC | 10,70 bA | 10,15 bB | 9,68 dC |
| FR04 | - | - | - | - | - | - |
| FR10 | - | - | - | - | - | - |
| FR14 | - | 66,86 bA | 62,40 cB | - | 10,84 aA | 10,28 cB |
| FR15 | - | - | - | - | - | - |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 12 – Comprimento e largura de macroconídios dos isolados de *Neonectria ditissima* produzidos em colônias de 20 dias de idade nos meios de cultura BDA, SN e AM. (Conclusão)

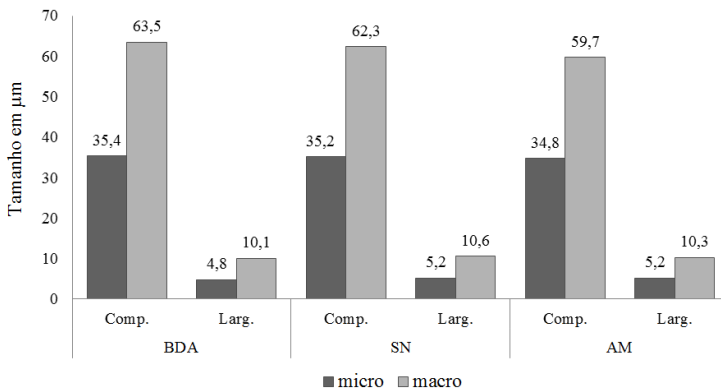
| Isolado | Comprimento macroconídio | | | Largura macroconídio | | |
|---------|--------------------------|----------|----------|----------------------|----------|----------|
| | BDA | SN | AM | BDA | SN | AM |
| CPi01 | - | - | - | - | - | - |
| CPi02 | 64,43 cB | - | 69,80 aA | 10,13 dB | - | 10,50 bA |
| CPi03 | - | - | - | - | - | - |
| CPi05 | - | - | 55,50 eA | - | - | 10,50 bA |
| CPi06 | 65,80 bA | - | - | 10,47 bA | - | - |
| CPi09 | 64,82 cA | - | 58,60 dB | 10,50 cA | - | 10,50 bA |
| CPi10 | - | - | - | - | - | - |
| CPi14 | - | - | - | - | - | - |
| CPi16 | - | - | - | - | - | - |
| CPi17 | - | - | - | - | - | - |
| AD03 | 66,75 aB | 68,13 aA | - | 9,84 dB | 11,08 aA | - |
| AD04 | - | - | - | - | - | - |
| AD05 | - | 65,26 cA | 64,80 cA | - | 10,72 aA | 10,72 aA |
| AD06 | - | - | - | - | - | - |
| AD07 | 66,84 aA | 65,00 cB | 66,16 bA | 10,75 bA | 10,79 aA | 11,00 aA |
| AD08 | - | - | - | - | - | - |
| AD10 | 62,96 dB | 65,07 cA | 64,60 cA | 10,50 cB | 10,86 aA | 10,50 bB |
| FROL01 | 66,56 aA | 57,68 eB | - | 11,60 Aa | 9,90 bB | - |
| FROL02 | - | 54,89 fB | 63,36 cA | - | 10,19 bB | 10,60 bA |
| FROL03 | 65,63 bA | 59,81 dB | - | 10,96 bA | 10,33 bB | - |
| FROL04 | - | - | - | - | - | - |
| FROL05 | 64,70 cA | 64,86 cA | - | 10,86 bA | 10,79 aA | - |
| FROL06 | 64,96 cA | 60,03 dB | 64,26 cA | 10,75 bA | 10,43 bB | 10,90 aA |
| FROL07 | - | - | - | - | - | - |
| FROL08 | - | - | 51,76 fA | - | - | 10,06 cA |
| FROL09 | 52,06 eB | 59,23 dA | 49,62 gC | 10,50 cA | 10,82 aA | 9,50 dB |
| FROL10 | - | - | - | - | - | - |
| CV % | | 2,31 | | | 4,14 | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

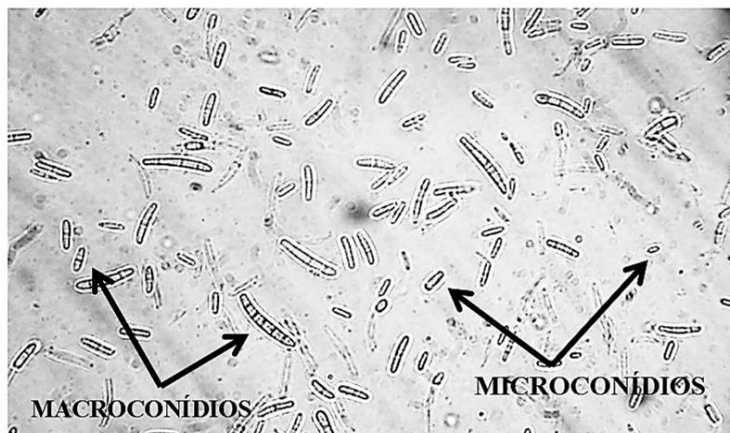
As médias de comprimento e largura dos microconídios nos meios BDA, SN e AM foram de 35,4x4,8, 35,2x5,2 e 34,8x5,2 μm , respectivamente (Figura 14). Os macroconídios tiveram comprimento e largura de 63,5x10,1, 62,3x10,6 e 59,7x10,3 μm nos meios BDA, SN e AM (Figura 14). A variação geral no comprimento e largura dos micro e macroconídios nos três meios foram semelhantes. No meio BDA, que proporcionou maior crescimento das colônias, a variação do comprimento dos microconídios foi de 30,50 a 42,54 μm e a largura de 4,50 a 6,89 μm (Figura 15). Nos macroconídios, a variação ficou em torno de 52,06 a 66,84 μm de comprimento e 9,84 a 11,60 μm de largura (Figura 15).

Figura 14 – Médias do comprimento e largura de micro e macroconídios dos isolados de *Neonectria ditissima* nos meios de cultura BDA, SN e AM.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Figura 15 – Variação no comprimento e largura de micro e macroconídios dos isolados de *Neonectria ditissima* em meio BDA.



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Todos os isolados produziram conídios de tamanho micro ou macro, ou ainda, micro e macro no mesmo isolado.

Em caracterização morfológica de *Nectria galligena*, Zeller (1926) relata que os macroconídios possuem de 5 a 7 septos e tamanho de $52-64 \times 4,5-5,5 \mu\text{m}$ e os microconídios de tamanho $4-7 \times 1-2 \mu\text{m}$ e asseptados. Jones e Aldwinckle (1990) citam que o tamanho dos macroconídios pode variar de acordo com o número de septos, sendo $4-10 \times 4,5-5,5 \mu\text{m}$ os que possuem um septo e podendo chegar a $45-65 \times 4-7 \mu\text{m}$ os que tem até sete septos.

Entretanto, neste estudo, as medidas dos micro e macroconídios foram maiores, mostrando maior diversidade no tamanho do que o relatado na literatura. Brayford et al. (2004) mostra que existe grande diversidade entre os conídios do gênero *Neonectria* e *Cylindrocarpon*.

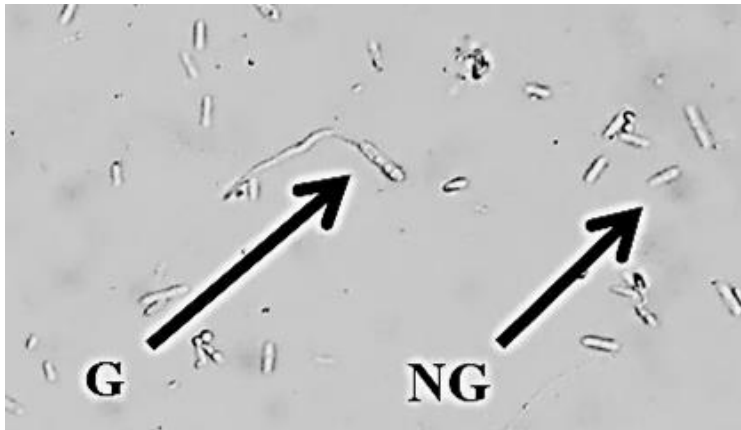
Chaverri et al. (2011) delimita a variação dos conídios nos gêneros *Neonectria* e *Cylindrocarpon* em 25-65x4-9 µm para macroconídios e 3-15x2-5 µm para microconídios, acordando com as medidas encontradas nos ensaios desta pesquisa.

A variação na quantidade de septos está relacionada com a nutrição, umidade, temperatura entre outros fatores (ZELLER, 1926).

4.1.6 Germinação dos conídios de cinco isolados de *Neonectria ditissima*

A germinação dos conídios foi avaliada pelo percentual de conídios germinados. Foi considerado germinado o conídio que possuía tubo germinativo com o dobro do tamanho do respectivo (Figura 16).

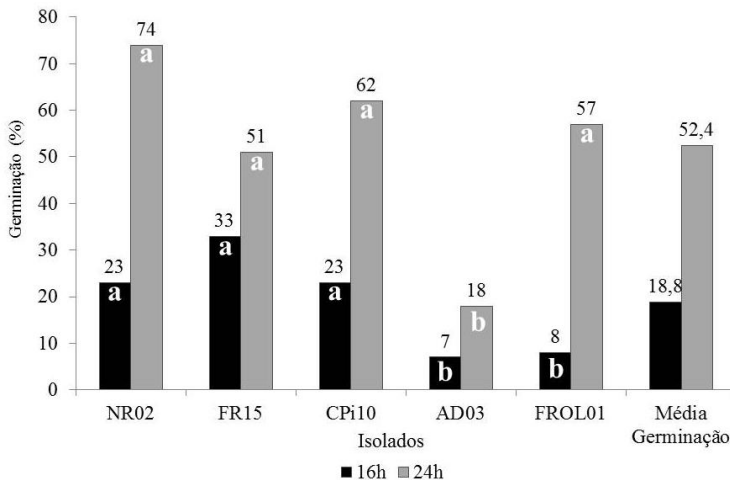
Figura 16 – Indicação do conídio de *Neonectria ditissima* Germinado (G) e Não-Germinado (NG).



Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Até as primeiras oito horas não foi verificada germinação efetiva dos conídios. A partir de 16 horas foram encontrados conídios germinados com o dobro de seu tamanho. Em 24 horas, obteve-se 74% de germinação no isolado NR02, e a menor taxa foi obtida no isolado AD03 com 18% (Figura 17).

Figura 17 – Taxa e média de germinação dos conídios de cinco isolados de *Neonectria ditissima* de cada pomar dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em 16 e 24 horas.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Pesquisando o efeito da temperatura e umidade na infecção de *Nectria galligena*, Latorre et al. (2002) obteve resultados *in vitro* sobre a germinação de conídios onde a temperatura ótima foi de 20 a 25°C com mais de 80% de germinação em 24 hs. Esse resultado é semelhante ao ensaio realizado, onde foi verificada germinação de 74% no mesmo período de 24 hs. Dubin e English (1975) também constataram ótima germinação

de conídios de *N. galligena* em temperaturas entre 21 e 24°C.

Em teste de viabilidade de conídios de *N. galligena*, Maxin et al. (2012) verificaram que os conídios germinaram 24 hs após tratamento de calor com imersão da suspensão dos esporos em água quente. Ainda, definiu a temperatura letal (TE50) em 42,9°C para o fitopatógeno.

4.2 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS *IN VITRO*

Os três isolados de *N. ditissima* testados tiveram diferentes crescimentos miceliais nos meios de cultura com fungicidas incorporados. As médias de crescimento micelial nos meios com o fungicida tebuconazole (T6) e com o tiofanato metílico (T7), foram inferiores a 9 mm (Tabela 13).

Em seguida, o meio com piraclostrobina (T3) proporcionou menor média de crescimento micelial. Os demais meios com os fungicidas incorporados tiveram médias próximas e superiores a 20 mm (Tabela 13).

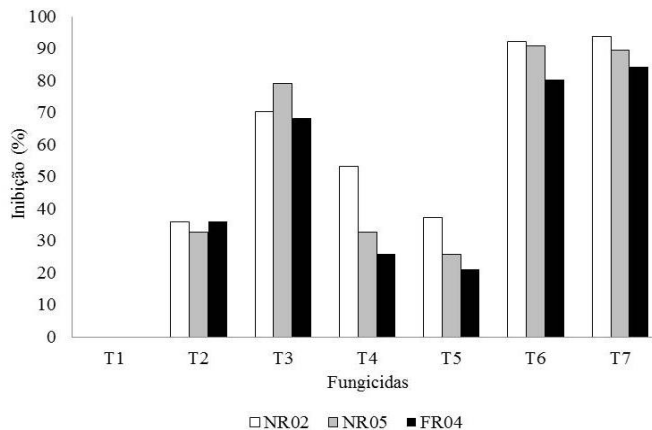
O percentual de inibição calculado para os três isolados avaliados foi maior que 60% no meio com a piraclostrobina, e maior que 80% nos meios com o tebuconazole e o tiofanato metílico. No meio com fosetil-Al (T4), apenas o isolado NR02 teve inibição maior que 50% (Figura 18). Os demais fungicidas não foram eficientes, mostrando maior crescimento das colônias (Figura 19).

Tabela 13 – Crescimento micelial de isolados de *Neonectria ditissima* em mm nos meios AM com fungicidas incorporados.

| Tratamentos | Isolados | | |
|-------------|----------|----------|----------|
| | NR02 | NR05 | FR04 |
| T1 | 25,90 aA | 24,38 bA | 21,59 cA |
| T2 | 23,33 aB | 22,35 bB | 18,48 cC |
| T3 | 14,38 aC | 10,99 bC | 11,47 bD |
| T4 | 22,95 aB | 22,34 bB | 20,67 cB |
| T5 | 23,44 aB | 24,01 aA | 21,70 bA |
| T6 | 8,69 aD | 8,16 bD | 8,91 aE |
| T7 | 8,32 aD | 8,48 aD | 8,03 aF |
| CV % | 2,33 | | |

T1 = Ágar Malte; T2 = Captana; T3 = Piraclostrobina; T4 = Fosetil-Al; T5 = Fosfito K; T6 = Tebuconazole e T7 = Tiofanato metílico.
Fonte: produção do próprio autor, 2015.

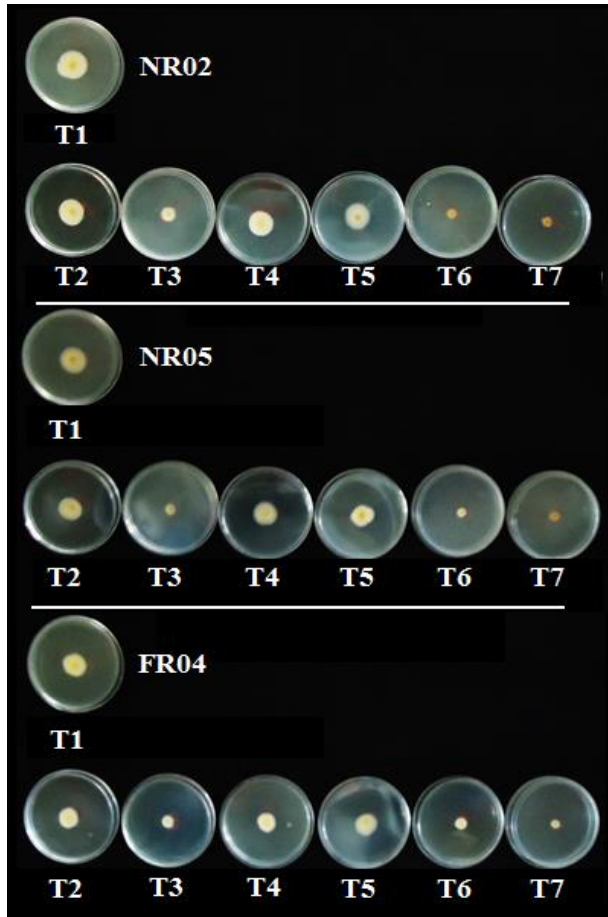
Figura 18 – Percentual de inibição (%I) das colônias de três isolados de *Neonectria ditissima* em meio ágar extrato de malte (AM) com fungicidas incorporados.



T1 = Ágar Extrato de Malte; T2 = Captana; T3 = Piraclostrobina; T4 = Fosetil-Al; T5 = Fosfito K; T6 = Tebuconazole e T7 = Tiofanato metílico.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Figura 19 – Crescimento micelial de três isolados de *Neonectria ditissima* no meio ágar extrato de malte (AM) adicionado com fungicidas.



T1 = Ágar Extrato de Malte; T2 = Captana; T3 = Piraclostrobina; T4 = Fosetil-Al; T5 = Fosfito K; T6 = Tebuconazole e T7 = Tiofanato metílico.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Walter et al. (2014) testando a sensibilidade de *Neonectria ditissima* ao fungicida carbendazim, constatou sensibilidade em 19 dos 139 isolados utilizados.

Em estudo com sensibilidade ao fungicida tiofanato metílico, Weber e Palm (2010) comparam a resistência de *Neofabrea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* e *Neonecctria galligena* ao fungicida do grupo dos benzimidazóis. No estudo, os fitopatógenos foram separados em categorias de resistência, onde *N. galligena* (sin. = *N. ditissima*) apresentou resistência intermediária à dose entre 1,00-1,67 ppm. Neste trabalho, o fungicida tiofanato metílico foi mais eficiente em meio de cultura, reduzindo o crescimento micelial dos isolados de *N. ditissima* testados.

Em outros trabalhos realizados com diversos fungos, mostram uma resistência dos fitopatógenos ao princípio ativo tiofanato metílico como *Colletotrichum lindemuthianum* e *Monilia fructicola* (SARTORATO, 2006; YOSHIMURA et al., 2004). Ainda, estudo com sensibilidade na germinação de esporos, Blum e Reis (2009) sugerem que os fungicidas com princípio ativo piraclostrobina reduzem o percentual de germinação de uredósporos de *Phakopsora pachyrhizi*.

4.3 AGRESSIVIDADE DOS ISOLADOS DE *Neonectria ditissima* EM FRUTOS DAS CULTIVARES GALA E FUJI

Todos os isolados foram agressivos e virulentos nas duas cultivares testadas. A incubação dos frutos da cv. Gala em 14 dias mostrou médias das lesões de 9,38 mm para o isolado CPi10 e 16,25 mm para o NR05 (Tabela 14). Na cv. Fuji, a menor média foi de 10,19 mm para o isolado AD03 e a maior de 17,86 mm para o FROL05 (Tabela 14).

As lesões nos frutos foram confirmadas por reisolamento do tecido de transição da podridão obtida. As colônias que cresceram são características de *N. ditissima* (Figura 20). As maiores médias de lesões das cvs. Gala e Fuji foram no grupo FROL com médias de 13,77 mm e 15,48 mm, respectivamente (Tabela 14).

Tabela 14 – Médias das podridões em frutos das cvs. Gala e Fuji com fermento dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em 14 dias de incubação. (Continua...)

| Isolado | Virulência | | | |
|---------|----------------|------------|----------------|------------|
| | Gala | Média Gala | Fuji | Média Fuji |
| NR02 | 12,85 c | | 12,92 g | |
| NR03 | 10,27 d | | 13,13 g | |
| NR05 | <u>16,25 a</u> | 12,68 | 15,44 d | 13,58 |
| NR10 | 11,38 d | | 12,86 g | |
| FR04 | 12,87 c | | 12,94 g | |
| FR10 | 12,60 c | | 13,23 f | |
| FR14 | 11,06 d | 11,73 | 16,77 c | 15,14 |
| FR15 | 10,42 d | | <u>17,64 a</u> | |
| CPi01 | 10,99 d | | 14,79 e | |
| CPi02 | 10,03 d | | 13,36 f | |
| CPi03 | 12,07 c | | 11,96 h | |
| CPi05 | 11,34 d | | 11,42 h | |
| CPi06 | 12,62 c | | 12,06 h | |
| CPi09 | 12,07 c | 11,26 | 11,98 h | 12,10 |
| CPi10 | 9,38 d | | 11,86 h | |
| CPi14 | 12,01 c | | 10,54 i | |
| CPi16 | 11,04 d | | 11,18 i | |
| CPi17 | 11,05 d | | 11,92 h | |
| AD03 | 11,85 c | | 10,19 i | |
| AD04 | 10,54 d | | 10,77 i | |
| AD05 | 12,42 c | | 12,05 h | |
| AD06 | 11,80 c | 11,71 | 15,51 d | 14,38 |
| AD07 | 10,58 d | | 16,64 b | |
| AD08 | 12,75 c | | <u>17,75 a</u> | |
| AD10 | 12,03 c | | <u>17,77 a</u> | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 14 – Médias das podridões em frutos das cvs. Gala e Fuji com ferimento dos 35 isolados de *Neonectria ditissima* dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC em 14 dias de incubação. (Conclusão)

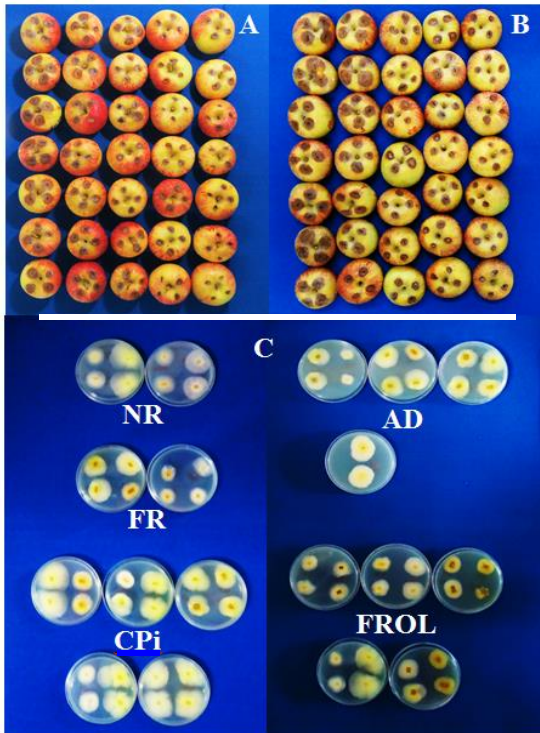
| Isolado | Virulência | | | |
|------------|------------|------------|---------|------------|
| | Gala | Média Gala | Fuji | Média Fuji |
| FROL01 | 16,11 a | 13,77 | 17,59 a | 15,48 |
| FROL02 | 16,01 a | | 12,99 g | |
| FROL03 | 10,85 d | | 14,98 e | |
| FROL04 | 14,36 b | | 15,92 c | |
| FROL05 | 12,67 c | | 17,86 a | |
| FROL06 | 14,63 b | | 17,72 a | |
| FROL07 | 11,83 c | | 13,48 f | |
| FROL08 | 10,79 d | | 13,50 f | |
| FROL09 | 15,47 a | | 13,11 g | |
| FROL10 | 15,05 b | | 17,69 a | |
| Testemunha | 0,00 e | 0,00 | 0,00 j | 0,00 |
| Média | 12,29 | | 14,04 | |
| CV % | 8,48 | | 2,05 | |

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

No experimento de Swinburne (1971), verificou-se resultado semelhante com frutos colhidos no estágio de colheita, feridos e inoculados com o patógeno *N. galligena*. Lolas (2001) também avaliou a virulência de isolados de *N. galligena* em frutos, obtendo resultados parecidos na comparação da habilidade de iniciar a infecção e progredir com a podridão.

Figura 20 – Maçãs das cvs. Gala (A) e Fuji (B) com sintoma de podridão causada pela inoculação dos isolados de *Neonectria ditissima* e colônias do reisolamento de confirmação de cada pomar dos municípios de Vacaria/RS e Água Doce/SC (C).



NR = Nova Escócia/Rubifrut; FR = Frutival; CPi = Capão dos Pinheiros; AD = Pomar Água Doce, FROL = Frutirol.
 Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Xu e Robinson (2010) testaram o efeito da inoculação com suspensão de conídios na maturação de frutos de maçãs de várias cultivares em pré-colheita. Como resultado, avaliaram que a virulência dos isolados diminui em relação à maturidade da fruta. Nos testes com os 35 isolados de *N. ditissima*, as cultivares em estágio de

colheita Gala e Fuji foram susceptíveis as infecções, apresentando podridão característica nos 14 dias de avaliação.

Em virulência de isolados de *Cryptosporiopsis* spp., Comparin (2009) relatou que os isolados foram virulentos em maçãs das cvs. Fuji e Pink Lady, independente da indução de ferimento ou não, havendo sintomas característicos da podridão “olho-de-boi” em 15 dias após a inoculação.

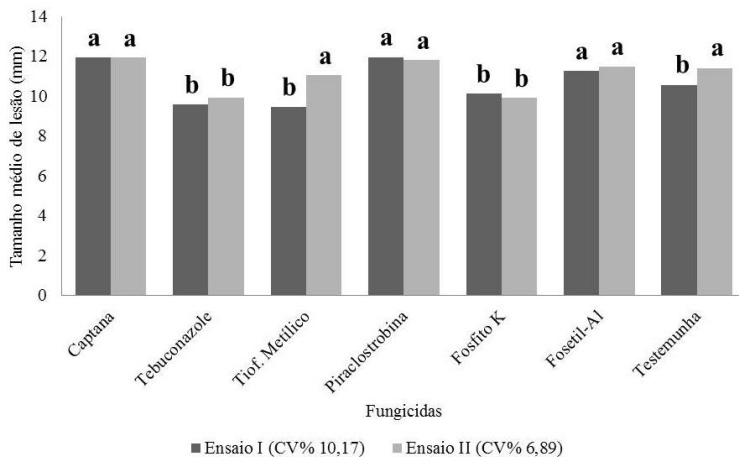
4.4 EFICIÊNCIA DE FUNGICIDAS UTILIZADOS ISOLADOS E EM MISTURA PARA TRATAMENTO EM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM *Neonectria ditissima*

4.4.1 Fungicidas utilizados isoladamente em mudas de macieira cv. Gala inoculadas com *Neonectria ditissima*

No ensaio em condições controladas, todas as lesões inoculadas nas mudas expressaram sintoma de cancro europeu. Os fungicidas não foram eficientes na proteção e controle do patógeno.

Nos ensaios I e II (Figura 21), os mesmos três fungicidas, piraclostrobina, captana e fosetil-Al não diferiram da testemunha tratada com água. Esses fungicidas tiveram médias superiores de tamanho de lesões nas mudas.

Figura 21 – Tamanho médio de lesões em mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados isoladamente. Ensaio sob condições controladas.

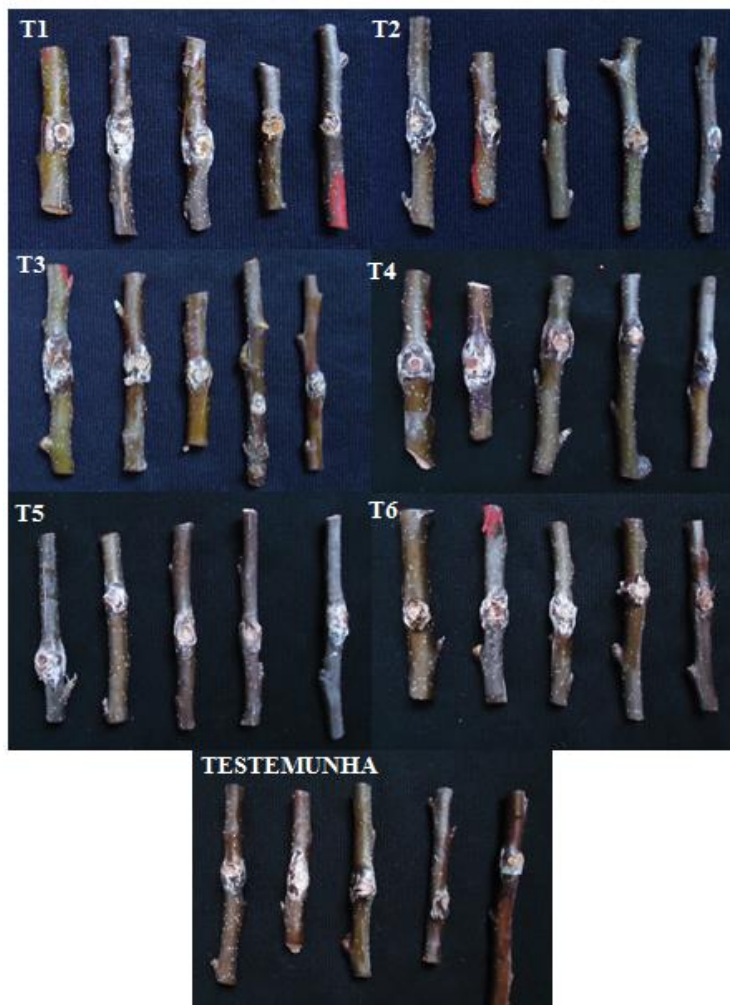


Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Nos tratamentos com os fungicidas tebuconazole e tiofanato metílico, as lesões infectadas apresentaram menor tamanho do que a testemunha (Figura 22). Esse resultado se iguala ao teste de eficiência de fungicidas, onde ocorreu menor crescimento micelial dos isolados a esses fungicidas.

Figura 22 – Lesões retiradas das mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados isoladamente em ensaio sob condições controladas.



T1 = Captana; T2 = Tebuconazole; T3 = Tiofanato Metílico; T4 = Piraclostrobina; T5 = Fosfito de K; T6 = Fosetil-Al; T7 = Testemunha.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Em experimentos de macieiras podadas e mantidas em estufa, Xu e Butt (1996) inocularam *N. galligena* com suspensão de conídios e trataram as plantas com fungicidas protetores e sistêmicos após 36 hs. Segundo o teste, em todos os locais inoculados desenvolveu-se lesão de cancro em comparação com a testemunha tratada com água. Esse resultado assemelha-se ao teste com as mudas, onde foi observada a lesão nos locais de inoculação.

Garkava-Gustavsson et al. (2013) observou em casa de vegetação que, inoculações com suspensão de conídios de *N. ditissima* em cortes de ramos de um ano e sem tratamento químico, desenvolveram as primeiras lesões após dez dias.

Em evidência, os tratamentos químicos com fungicidas são ineficientes, preventivamente e curativamente, quando a pressão de inóculo é alta. Ainda, mesmo com o controle da temperatura (22°C), houve infecção pelo patógeno. Isso mostra que em cortes, a temperatura não tem influência na infecção, sugerindo que os esporos não germinados estejam nos tecidos mais internos, onde o tratamento curativo não tenha curado completamente (Xu e Butt, 1996).

4.4.2 Fungicidas utilizados em mistura em mudas de macieira cv. Gala inoculadas com *Neonectria ditissima*

No primeiro ensaio no ano de 2013, as misturas não foram eficientes para controlar a infecção de *N. ditissima*, inoculado em ferimentos nas mudas de macieira (Figura 23). A média de incidência das mudas que apresentaram lesões de cancro foi acima de 65 % nos dois períodos de tratamento e chegando a 75 % em 15 minutos, e a 87,5 % em 60 minutos após 45 dias de inoculação e tratamento (Figura 24).

Figura 23 – Lesões das mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados em mistura no ensaio do ano de 2013.



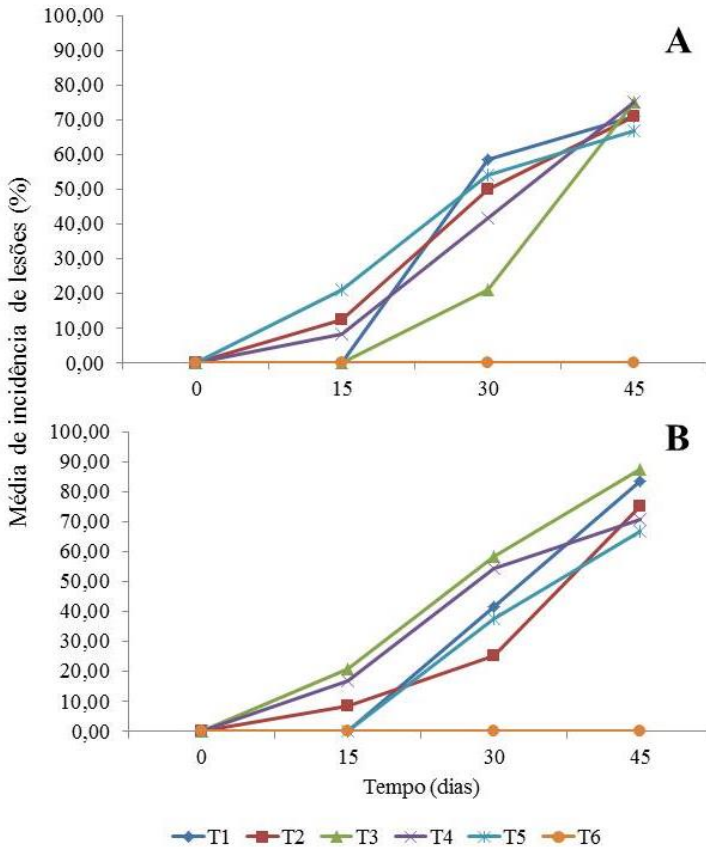
T1 = captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T2 = tebuconazole, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T3 = fosetil-Al, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T4 = piraclostrobina, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T5 = Testemunha tratada com água.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Os tratamentos de imersão das mudas durante 15 minutos nas misturas dos fungicidas tiveram baixa diferença (Tabela 15). O tratamento com captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio (T1), foi menos eficiente com média de tamanho de lesões próxima a testemunha tratada com água, 18,03 mm e 18,82 mm, respectivamente. Os demais tratamentos não diferiram estatisticamente, porém, as mudas tratadas com fosetil-Al, tiofanato metílico e fosfito de potássio (T3) apresentaram menor tamanho de lesão com 9,30 mm.

Os tratamentos de imersão das mudas nas misturas em 60 minutos não diferiram, apresentando médias de tamanho de lesões próximas entre elas (Tabela 15). Ao contrário do período de 15 minutos, o tratamento com fosetil, tiofanato metílico e fosfito de potássio (T3) ficou com maior média de tamanho de lesões com 16,28 mm, pouco maior que a testemunha com água com 16,21 mm.

Figura 24 – Incidência de lesões nas mudas de macieira cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas utilizados em mistura pelos períodos de 15 minutos (A) e 60 minutos (B) no ensaio do ano de 2013.



T1 = captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T2 = tebuconazole, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T3 = fosetil-Al, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T4 = piraclostrobina, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T5 = testemunha tratada com água; T6 = Testemunha não inoculada.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Tabela 15 – Médias do tamanho das lesões de cancro europeu em mudas de macieira da cv. Gala, inoculadas com *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas em misturas sob dois períodos de tempo antes do plantio a campo no ano de 2013.

| Tratamentos | Períodos | |
|-------------|------------|------------|
| | 15 minutos | 60 minutos |
| T1 | 18,03 a | 14,73 a |
| T2 | 13,46 b | 15,27 a |
| T3 | 9,30 b | 16,28 a |
| T4 | 11,77 b | 14,39 a |
| Testemunha | 18,82 a | 16,21 a |
| CV % | 29,79 | 18,45 |

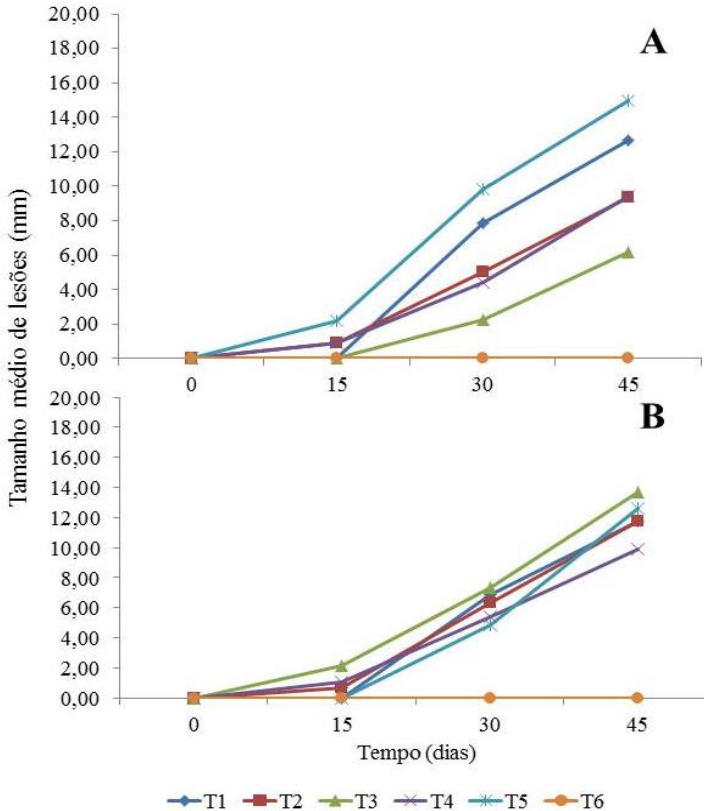
T1 = captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T2 = tebuconazole, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T3 = fosetil-Al, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T4 = piraclostrobina, tiofanato metílico e fosfito de potássio; Testemunha = tratamento com água.

Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Scott-Knock 5%.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

Os dois períodos de imersão nas misturas não foram eficientes na proteção e controle das mudas inoculadas. Em todos os tratamentos houve progresso da doença, com aparecimento das primeiras lesões em no máximo 30 dias (Figura 25). Apenas o tratamento com captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio (T1) se igualou nos dois períodos de imersão, desenvolvendo lesões após 15 dias.

Figura 25 – Tamanho médio de lesões de cancro europeu em mudas de macieira da cv. Gala, inoculadas com isolados de *Neonectria ditissima* e tratadas com fungicidas em misturas sob os períodos de 15 minutos (A) e 60 minutos (B) de antes do plantio a campo no ano de 2013.



T1 = captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T2 = tebuconazole, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T3 = fosetil-AI, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T4 = piraclostrobina, tiofanato metílico e fosfito de potássio; T5 = testemunha tratada com água; T6 = Testemunha não inoculada.

Fonte: produção do próprio autor, 2015.

No ensaio do ano de 2014, não houve sintomas de lesões no tecido das mudas durante o mesmo período de avaliações do ano de 2013. Segundo dados meteorológicos da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa / Estação Experimental de Fruticultura de Clima Temperado e da Estação de Previsão do Centro de Informações de Recursos Ambientais e Hidrometeorologia de Santa Catarina – Ciram, as médias climáticas no período do ensaio em 2013 foram de 26°C de temperatura máxima e 128,5 mm de precipitação. Em 2014, a máxima na temperatura foi de 31,5°C e 140 mm precipitados. Provavelmente a combinação dos fatores climáticos pode ter contribuído para manter o patógeno em estado latente, o qual foi reisolado em meio BDA após seis meses de inoculação das plantas.

De acordo com o informe fitossanitário N° 1 da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI (2012), o aparecimento dos sintomas do cancro europeu pode levar até três anos depois do plantio da muda infectada.

Cooke, Watters e Brown (1993) testaram o efeito da aplicação de fungicidas em mudas de macieiras inoculadas a fim de verificar o efeito curativo na redução da lesão dos cancros. Em todos os locais inoculados, cinco meses depois da aplicação dos tratamentos, havia lesões de cancro europeu. No ensaio realizado em 2013, todos os tratamentos falharam na prevenção do cancro. O efeito dos fungicidas não foram eficientes para evitar a infecção pelo patógeno em nenhum dos períodos de tratamento.

Em outro estudo com mudas de macieira para verificação da resistência de cultivares, Garkava-Gustavsson et al. (2013) obtiveram os primeiros sintomas de lesões de cancro europeu entre 15 e 19 dias. Dubin e English (1974) mostraram que as lesões de queda de

folhas ainda são susceptíveis 24 hs depois da queda. No experimento realizado a campo, as plantas foram inoculadas 24 hs após o tratamento com os fungicidas em misturas e desenvolveram os primeiros sintomas de cancro europeu entre 15 e 30 dias.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O maior crescimento micelial de *Neonectria ditissima* ocorre no meio BDA (batata-dextrose-ágar), assim como o melhor índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM).

A formação de esporodóquios é maior em meio BDA aos 20 dias de incubação e a coloração das colônias é influenciada pelo meio de cultura. A pigmentação mais característica do fungo no meio de cultura BDA é marrom com bordas em tons de bege e cor da colônia em tons de bege.

A esporulação em meio de cultura é mais significativa em meio SN (SNAY). Os conídios são de tamanho micro ou macro e, podem ser produzidos pelo mesmo isolado/patógeno, os dois tipos de tamanho, bem como apenas um tipo. A germinação efetiva dos conídios ocorre a partir de 16 horas em suspensão.

Os fungicidas incorporados em meio de cultura mais eficientes foram o tebuconazole e tiofanato metílico.

Em frutos das cultivares Gala e Fuji, os isolados foram igualmente virulentos.

Os isolados coletados em pomares do município de Vacaria/RS e Água Doce/SC são iguais em características morfológicas e fisiológicas.

Os fungicidas tebuconazole e tiofanato metílico, utilizados isoladamente em ambiente controlado, reduziram o tamanho das lesões.

As misturas de fungicidas não foram eficientes no controle das infecções em mudas inoculadas com *N. ditissima*. Os períodos de tratamento de 15 e 60 minutos não diferem entre si. Apenas a mistura de fosetil-Al com tiofanato metílico e fosfito de potássio no período de 15 minutos reduziu a lesão causada pelo patógeno. Contudo, o tratamento com captana, tiofanato metílico e fosfito de potássio atrasou o início da infecção da doença em 15 dias.

Assim, apenas a aplicação de fungicidas não pode proteger e/ou controlar as infecções por *Neonectria ditissima*. O manejo integrado aliado a práticas de eliminação de cancos já estabelecidos em ramos, caules e frutos para fora do pomar com incineração e manutenção da limpeza, auxilia na prevenção e aparecimento de novos focos da doença.

6 REFERÊNCIAS:

AGRIOS, George N. **Plant Pathology**, 5 ed, Flórida, 2005. 922p.

ALFENAS, A.C. et al. Isolamento de fungos do tecidos de órgãos lenhosos ou carnosos (troncos, raízes, galhos grossos e frutos). In: **Métodos em fitopatologia**, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, p. 56-57. 2007.

ALVES, S.A.M. Controle do Cancro Europeu das Pomáceas. **Apresentação Workshop**. Vacaria. 2013. Disponível em: <http://www.agapomi.com.br/arquivos/workshop_Silvio_Alvez.pdf>. Acesso em 06-agosto-2014.

AMPONSAH, N.P.; WALTER, M.; SCHEPER, R.W.A. Agar media for isolation of *Neonectria ditissima* from symptomatic and asymptomatic apple tissues and production of infective conidia. In: **New Zealand Plant Protection**. n. 67, New Zealand, p. 116-122. 2014.

ANDRADE, E.M., et al. Caracterização morfofocultural e molecular de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* patogênicos ao mamoeiro. In: **Fitopatologia**. n. 32, p. 21-31. 2007.

ASHCROFT, J.M. European Canker of Black Wlanut and Other Trees. **Bulletin 261**. College of Agriculture – West Virginia University, 1934. 52p.

BAILEY, L.H. European Canker caused by *Nectria galligena* Bres. In: **Manual of Fruit Diseases**. Norwood, p. 125-129. 1917.

BALBACH, A.; BOARIM, D.S.F. **As frutas na medicina natural**, 1 ed. Itaquaquecetuba, p. 151. 1995.

BERESFORD, R. Epidemiologia. **Anais... SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE *Nectria galligena* (CANCRO EUROPEU)**, Vacaria, 2012. 24p.

BLEICHER, J. História da macieira. In: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI. **A cultura da macieira**. 1 ed, 2 tiragem, Florianópolis, p. 29-36. 2006.

BLUM, M.M.C.; REIS, E.M. Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas *in vitro*. In: **Sensibilidade de *Phakopsora pachyrhizi* a fungicidas**. Tese (doutorado em Agronomia), p. 61-81. 2009.

BOGO, A. et al. Caracterização morfológica de isolados de *Cryptosporiopsis perennans* em diferentes meios de cultura. In: **Tropical Plant Pathology**. v. 33, n. 3, p. 248-251. 2008.

BONETI, J.I. da S. et al. Evolução da cultura da macieira. In: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI. **A cultura da macieira**. 1 ed, 2 tiragem, Florianópolis, p. 37-57. 2006.

BRAYFORD, D. et al. *Neonectria* and *Cylindrocarpon*: the *Nectria mammoidea* group and species lacking microconidia. In: **Mycologia**. v. 3, n. 96, p. 572-597. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Secretaria de Política Agrícola. **Maçã**. Informativo n. 54, Brasília. 2013a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, Gabinete do Ministro. **Instrução Normativa N. 20**, Brasília, 2013b.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão – MPOG, IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola – LSPA**, v. 27, n. 11, Rio de Janeiro, 2014. 86p.

CAIXETA, A.O.; VIEIRA, B.S.; CANEDO, E.J. Efeito do fosfito de potássio sobre fungos fitopatogênicos do feijoeiro. In: **Cerrado Agrociências**. v. 3, Patos de Minas, p. 35-43. 2012.

CARNAUBA, J.P., et al. Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Scytalidium lignicola*. In: **Summa phytopathologica**. v. 33, n. 2, Botucatu, p. 199-200. 2007.

CASTRO, C.V.B. Caracterização morfológica e molecular de isolados de *Rhizoctonia solani* Kunh. 2007. 67f. **Dissertação (mestrado em Agronomia)** Universidade Federal da Amazônia, Belém.

CHAVERRI, P. et al. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. In: **Studies in Mycology**. n. 68, p. 57-78. 2011.

COOKE, L.R.; WATTERS, B.S.; BROWN, A.E. The effect of fungicide sprays on the incidence of apple canker (*Nectria galligena*) in Bramley's seedling. In: **Plant Pathology**. v. 42, p. 432-442. 1993.

COMPARIN, C.C. Variabilidade e diversidade de isolados de *Cryptosporiopsis spp.* associados à podridão “olho-de-boi” em maçãs na região sul do Brasil. **Dissertação (mestrado em Produção Vegetal)**. Lages, 2009. 47p.

CREEMERS, P. Nectria Canker. In: **Compendium of Apple and Pear diseases and pests**. 2 ed, Saint Paul, p. 49-51. 2014.

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

DUBIN, H.J.; ENGLISH, H. Factors affecting apple leaf scar infection by *Nectria galligena* conidia. In: **Phytopathology**. n. 64, p. 1201-1203. 1974.

DUBIN, H.J.; ENGLISH, H. Effects of temperature, relative humidity, and desiccation on germination of *Nectria galligena* conidia. In: **Mycologia**. n. 67, p. 83-88. 1975.

EDWARDS, J. **National diagnostic protocol for detection of *Neonectria ditissima* (European canker)**. v. 1.1, n. 21, Subcommittee on Plant Health Diagnostic Standards – SPHDS, Australian Government, p. 34. 2013. Disponível em: <<http://plantbiosecuritydiagnostics.net.au/wordpress/wp-content/uploads/2014/09/NDP-21-European-canker-Neonectria-ditissima-V1.1.pdf>>. Acesso em 20-agosto-2013.

EPAGRI, Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina. **Informe Fitossanitário**, n. 1, Florianópolis, 2012. 10p.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT. **Agricultural production/apple**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org.br>>. Acesso em 09-setembro-2014.

FERNANDEZ, M.R. Preparo da suspensão de inóculo e estimativa de sua concentração (densidade de inóculo). In: Manual para laboratório de fitopatologia, Passo Fundo, Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Trigo, p. 51-52. 1993. (EMBRAPA – CNPT, **Documentos**, 6).

FENN, M.E.; COFFEY, M.D. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. In: **Phytopathology**. n. 5, v. 74, p. 606-611. 1984.

FISCHER, I.H.; ALMEIDA, A.M.; GARCIA, M.J.D.M. Efeito de fungicidas no crescimento micelial de *Fusarium subglutinans* in vitro. In: **19ª Reunião Anual do Instituto Biológico – RAIB**. v. 68, São Paulo, p. 577-580. 2006.

GARKAVA-GUSTAVSSON, L. et al. Screening of apple cultivars for resistance to European Canker, *Neonectria ditissima*. In: **Acta Horticulturae**. v. 976, p. 529-536. 2013.

JONES, A.L.; ALDWINCKLE, H.S. Nectria Canker. In: **Compendium of apple and pear diseases**. Saint Paul, The American Phytopathological Society, p. 35-37. 1990.

IUCHI, V.L. Botânica e fisiologia. In: Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI. In: **A cultura da macieira**. 1 ed, 2 tiragem, Florianópolis, p. 59-104. 2006.

KIMATI, H. (*In memoriam*). Controle químico. In: **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. v. 1, 4 ed, São Paulo, p. 343-365. 2011.

KRUGNER, T.L. A natureza da doença. In: **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. v. 1, 3 ed, São Paulo, p. 34-44. 1995.

OGAWA, J.M.; ENGLISH, H. European (Nectria) Canker of Apple and Pear. In: **Diseases of temperate zone tree fruit and nut crops**. Oakland, p. 41-46. 1991.

LANGRELL, S.R.H. Molecular detection of *Neonectria galligena* (syn. *Nectria galligena*). In: **Mycological Reaserch**. v. 106, n. 3, Cambridge Journals, p. 280-292. 2002.

LATORRE, B.A. et al. The effect of temperature and wetness duration on infection and a warning system for European canker (*Nectria galligena*) of apple in Chile. In: **Crop Protection**. n. 21, p285-291. 2002.

LOLAS, M. Physiological and environmental factors associated with the disease expression of *Nectria galligena* Bres. in apples. **Tese (Ph.D)**, London, 2001. 164p.

MAXIN, P. et al. Hot-water dipping of apples to control *Penicillium expansum*, *Neonectria galligena* and *Botrytis cinerea*: effects of temperature on spore germination and fruit rots. In: **European Journal of Horticultural Science**. v. 77, n. 1, p. 1-9, 2012.

MUNIZ, M.S.F.; QUEIROZ, F.M.; MENEZES, M. Caracterização de isolados de *Phytophthora* patogênicos a *Citrus sinensis* no estado de Alagoas. In: **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 201-204. 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/fb/v29n2/19566.pdf>>. Acesso em 22-novembro-2014.

PADDOCK, W. European Canker in America. In: **Science**. v. 12, n. 295, p. 297-299. 1900. Disponível em: <http://www.jstor.org/stable/1628311?origin=JSTOR-pdf&seq=1#page_scan_tab_contents>. Acesso em 22-janeiro-2015.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B. Macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 30, n. 4, Jaboticabal, p. 857-1166. 2008. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v30n4/a01v30n4.pdf>>. Acesso em: 16-janeiro-2015.

PETRI, J.L. et al. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. Especial, Jaboticabal p. 48-56. 2011. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v33nspe1/a07v33nspe1.pdf>>. Acesso em: 03-novembro-2014.

POLONI, A. et al. Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policonidiais e monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. In: **Biociência**. v. 16, n. 1, Porto Alegre, p. 52-63. 2008.

PROTAS, J.F.S.; SANHUEZA, R.M. **Produção Integrada de Frutas: o caso da maçã no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 2003. 192p.

REZENDE J.A.M. et al. Conceito de doença, sintomatologia e diagnose. In: **Manual de Fitopatologia – Princípios e Conceitos**. v. 1, 4 ed, São Paulo, p. 52-56. 2011.

RODRIGUES, M.B.C. et al. Resistência a Benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. In: **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 42, n. 3, Brasília, p. 323-327. 2007.

SAMUELS, G.J. et al. Hypocreales of the Southeastern United States. In: **An Identification Guide**. n. 134, p. 1-145. 2006.

SANHUEZA, R.M.V. Cancro Europeu das Pomáceas (*Nectria galligena*). Embrapa Uva e Vinho, Bento Gonçalves, 16p. 1998. (Embrapa Uva e Vinho. **Circular Técnica**, 23).

SANHUEZA, R.M. et al. Caracterização e controle das doenças de verão na produção integrada de maçã. In: Embrapa Uva e Vinho. **Manejo da Macieira no sistema de Produção Integrada de Frutas**. 21 ed, Bento Gonçalves, p. 51-60. 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/4CaracteristicasControleDoencas_000fbp9myd102wx5eo0sa wqe3hiwptzx.pdf>. Acesso em: 18-novembro-2014.

SANHUEZA, R.M.; BONETI, J.I.; ALVES, S.A.M. Características e controle de *Neonectria galligena* nos países que a doença é endêmica. In: **Informe Fitossanitário CIDASC e EPAGRI**, Florianópolis, n. 1, 2012. 10p.

SANHUEZA, R.M. Presença do Cancro Europeu das pomáceas no Brasil ameaça a sustentabilidade da pomicultura do país. **Anais...** 47º Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Londrina. 2014.

SCHEPER, R.W.A.; et al. Effect of culture medium, light and air circulation on sporulation of *Neonectria ditissima*. In: **New Zealand Plant Protection**. n. 67, New Zealand, p. 123-132. 2014.

SARTORATO, A. Sensibilidade “in vitro” de isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* a fungicidas. In: **Pesquisa Agropecuária Tropical**. v. 36, n. 3, p. 211-213. 2006.

SILVA, J.L.; TEIXEIRA, R.N.V. Esporulação e crescimento micelial de *Fusarium solani* em diferentes meios de cultura e regimes de luminosidade. In: **Revista Agroambiente On-line**. Universidade Federal de Roraima, v. 6, n. 1, p. 47-52. 2012. Disponível em: <<http://revista.ufrr.br/index.php/agroambiente/article/view/604/664>>. Acesso em 20-janeiro-2015.

STADNIK, M.J.; MONDINO, P.; BUTIGNOL, C.A. Bases conceituais da proteção do cultivo da macieira. In: **Manejo Integrado de Doenças da Macieira**. 1 ed, Florianópolis, p. 1-20. 2009.

STRANDBERG, J. O. Isolation, storage, and inoculum production methods for *Alternaria dauci*. In: **Phytopathology**. v. 77, n. 7, p. 1008-1012. 1987.

SWINBURNE, T.R. European Canker of Apple (*Nectria galligena*). In: Review of Plant Pathology. v. 54, n. 10, Belfast, p. 787-799. 1975.

SWINBURNE, T.R. The infection of apples, cv. Bramley's Seedling, by *Nectria galligena* Bres. In: **Annals of Applied Biology**. n. 68, p. 253-262. 1971.

TAKAHAKI, L.M. Identificação de *Colletotrichum gloesporioides* de Atemóia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) por meio de caracterização patogênica, cultural e morfológica. **Dissertação (Mestrado)**. Botucatu, 2008. 46p.

TURECHEK, W.W. Apple diseases and their management. In: **Diseases of fruits and vegetables – Diagnosis and Management**. v. 1, United States, p. 49-51. 2004.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BETTI, J.A. Doenças da Macieira (*Mallus spp.*). In: **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. v. 2, 4 ed, São Paulo, p. 421-433. 2005.

WALTER, M. et al. Sensitivity of *Neonectria ditissima* to carbendazim fungicide in New Zealand. In: **New Zealand Plant Protection**. n. 67, New Zealand, p. 133-138. 2014.

WEBER, R.W.S; PALM, G. Resistance of storage rot fungi *Neofabraea perennans*, *N. alba*, *Glomerella acutata* and *Neonectria galligena* against thiophanate-methyl in Northern German apple production. In: **Journal of plant Diseases and Protection**. v. 117, Germany, p.185-191. 2010.

WEBER, R.W.S. Biology and control of the apple canker fungus *Neonectria ditissima* (syn. *N. galligena*) from a Northwestern European perspective. In: **Erwerbs-Obstbau**. v. 56, Germany, p. 95-107. 2014.

XU, X.; BUTT, D.J. Tests of fungicides for post-germination activity against *Nectria galligena*, causal agente of canker and fruit rot of apple. In: **Crop Protection**. v. 15, n. 6, p. 513-519. 1996.

XU, X.; ROBINSON, J.D. Effects of fruit maturity and wetness on the infection of apple fruit by *Neonectria galligena*. In: **Plant Pathology**. n. 59, p. 542-547. 2010.

YOSHIMURA, M.A. et al. Sensitivity of *Monilinia fruticola* from stone fruit to thiophanate-metyl, irpodione and tebuconazole. In: **Plant Diseases**. v. 88, p. 373-378. 2004.

ZELLER, S.M. European Canker of pomaceous fruit trees. **Station bulletin**, n. 222, Oregon Agricultural College, Corvallis, 1926. 52p.