

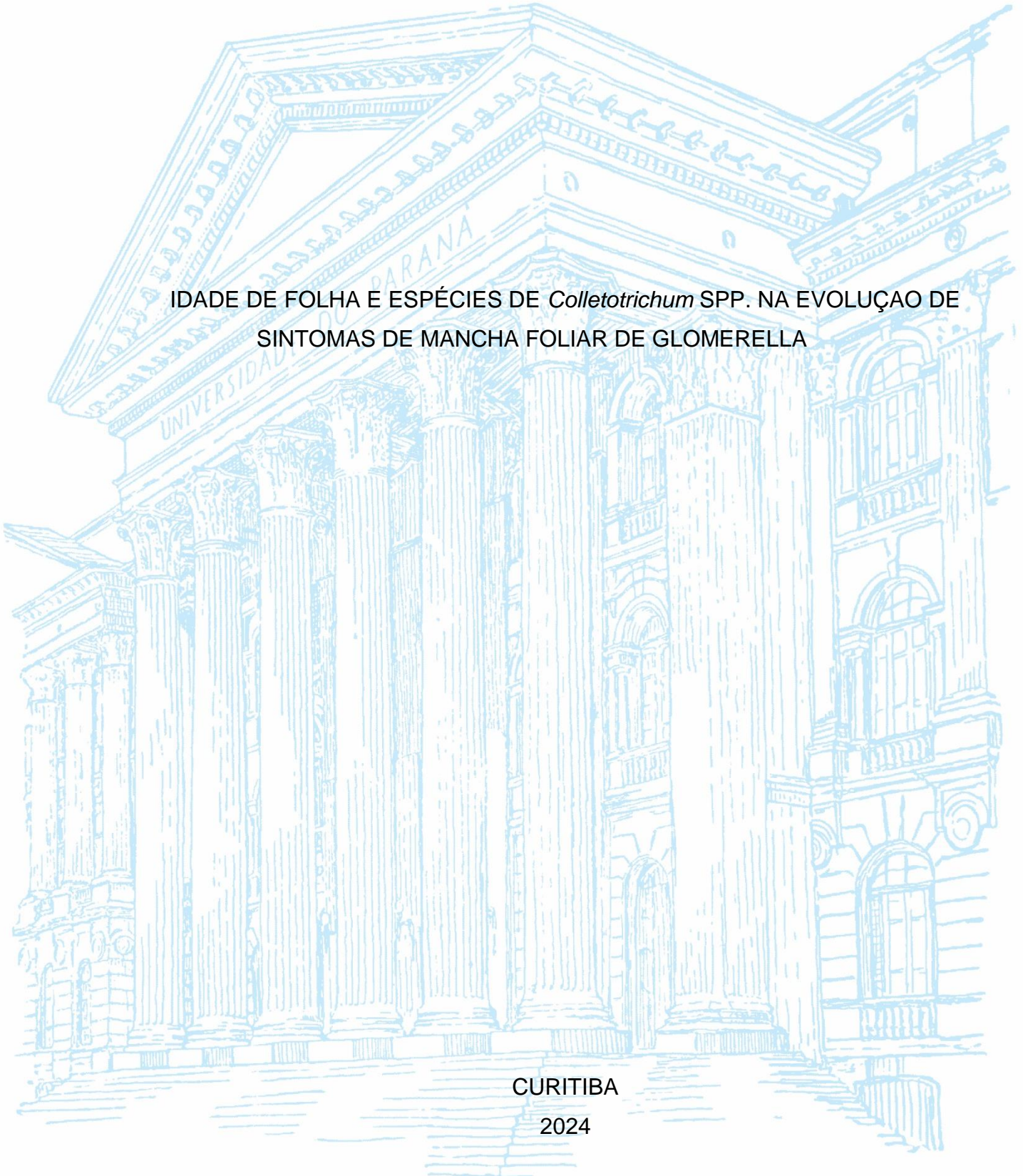
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NICOLLY CAMPEZI XAVIER

IDADE DE FOLHA E ESPÉCIES DE *Colletotrichum* SPP. NA EVOLUÇÃO DE
SINTOMAS DE MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

CURITIBA

2024



NICOLLY CAMPEZI XAVIER

IDADE DE FOLHA E ESPÉCIES DE *COLLETOTRICHUM* SPP. NA EVOLUÇÃO DE
SINTOMAS DE MANCHA FOLIAR DE *GLOMERELLA*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Agronomia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Engenheira Agrônoma.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Louise Larissa May De Mio.

CURITIBA

2024

TERMO DE APROVAÇÃO

NICOLLY CAMPEZI XAVIER

IDADE DE FOLHA E ESPÉCIES DE *Colletotrichum* SPP. NA EVOLUÇÃO DE SINTOMAS DE MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

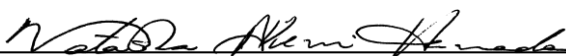
Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Engenheiro(a) Agrônomo(a) no Curso de Graduação em Agronomia, pela seguinte banca examinadora:



Orientadora Professora Doutora

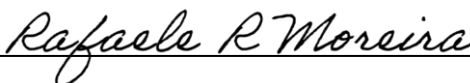
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade

Setor de Ciências Agrárias



Professora Doutora

Colegiado de Agronomia



Professora Doutora

Departamento de Fitotecnia

Curitiba, 14 de dezembro de 2024.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me conceder força, sabedoria e resiliência para superar os desafios ao longo desta jornada.

À minha mãe, Pollyana Campezi, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, paciência e apoio constante ao longo de todo meu processo de formação.

À minha avó, Elsa Campezi, e à minha tia, Paola Campezi, por sempre acreditarem em mim e por serem minhas maiores motivadoras. Este trabalho também é fruto do apoio de vocês.

Ao meu noivo, Gabriel dos Santos, agradeço por ser meu porto seguro. Seu incentivo nos momentos mais difíceis e sua compreensão durante minha ausência, foram fundamentais para que eu conseguisse concluir este trabalho.

Aos familiares que me apoiaram, em especial a Valdemor Ferreira Fortes, que foi minha primeira referência na agronomia e que tanto me ajudou. Sua presença espiritual me fortalece.

À minha orientadora, Prof^a. Dra. Louise Larissa May De Mio, pela dedicação e pelos ensinamentos valiosos. Sua paixão pela ciência é uma inspiração constante e me manteve motivada ao longo desta jornada.

Aos membros da banca examinadora, Dra. Rafaela Regina Moreira e Dra. Natasha Akemi Hamada, por dedicarem seu tempo e atenção à análise e contribuição deste trabalho.

Um agradecimento especial à Ma. Débora Petermann, pela atenção dedicada a mim desde a iniciação científica. Suas orientações e conselhos foram fundamentais para minha trajetória acadêmica e pessoal.

Aos amigos que torceram por mim e aos colegas do LEMID, por compartilharem comigo não só os momentos de aprendizado, mas também de descontração.

À Universidade Federal do Paraná, por proporcionar um ensino público e de qualidade, com professores e técnicos qualificados.

À empresa Fischer S/A agrícola, pelo acolhimento e ensinamentos durante o período de estágio obrigatório.

Agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada!

*“As coisas simples da vida são as mais extraordinárias,
somente os sábios conseguem vê-las.”*

-Paulo coelho

RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG), causada por espécies de *Colletotrichum* spp., é uma das principais doenças que afetam pomares de macieira no Brasil, especialmente em cultivares como 'Gala'. A doença compromete a produtividade devido à desfolha intensa e ao impacto negativo no acúmulo de reservas da planta. Este estudo teve como objetivo avaliar o progresso temporal da MFG em folhas de diferentes idades da cultivar 'Gala', inoculadas com isolados *Colletotrichum chrysophilum* (MdCc-33) e *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142), de forma isolada e em mistura. Para isso, foram realizados três ensaios *ex vivo* com folhas destacadas, sendo dois que serviram de pré-teste e um que serviu para avaliar a infecção latente, e também, um teste principal com mudas de macieira. As folhas destacadas e as mudas foram inoculadas com suspensão de conídios, exceto no ensaio para verificação da infecção latente, onde foi utilizada metodologia ONFIT. A avaliação ocorreu no 7º dia para os pré testes, 12º dia para ONFIT e durante aproximadamente 3 meses para o teste principal. Todos os ensaios foram realizados em duplicata, as avaliações ocorreram por meio de escala diagramática para a doença e, a infecção latente (ONFIT) avaliou-se por incidência do patógeno. Para análise estatística utilizou-se o software R e as médias, quando significativas foram comparadas com Tukey (0,05%). Os resultados do ensaio principal demonstraram que *C. chrysophilum* foi o patógeno mais agressivo, apresentando as maiores médias de severidade em ambos os ensaios. A mistura de dois isolados mostrou um comportamento intermediário, enquanto *C. nymphaeae* exibiu menor severidade, com progressão mais acentuada no segundo ensaios, realizado em condições climáticas mais amenas. Em relação à posição das folhas no ramo, as folhas mais velhas (posições inferiores) tiveram maior severidade na mistura dos isolados, enquanto *C. chrysophilum* se destacou em posições intermediárias. Embora as análises não tenham identificado diferenças estatísticas significativas entre as posições das folhas, os resultados sugerem que a idade das folhas influencia a manifestação dos sintomas e a agressividade dos isolados. Este trabalho contribui para o entendimento da epidemiologia da MFG ao demonstrar que o comportamento *Colletotrichum* spp. pode depender da idade da folha.

Palavras-chave: Mancha foliar de *Glomerella*; *Colletotrichum chrysophilum*; *Colletotrichum nymphaeae*; Mistura de isolados; idade da folha.

ABSTRACT

Glomerella leaf spot (GLS), caused by *Colletotrichum* spp., is one of the main diseases affecting apple orchards in Brazil, especially in cultivars such as 'Gala'. The disease compromises productivity due to intense defoliation and the negative impact on the accumulation of plant reserves. This study aimed to evaluate the temporal progression of GLS in leaves of different ages of the cultivar 'Gala', inoculated with the isolates *Colletotrichum chrysophilum* (MdCc-33) and *Colletotrichum nymphaeae* (MdCn-142), alone and in mixture. For this purpose, three *ex vivo* tests were performed with detached leaves, two of which served as pre-tests and one that served to evaluate latent infection, in addition to the main test with apple seedlings. The methodologies were applied by means of conidial suspension and formation of a humid chamber, except in the test to verify latent infection, in which the leaves had already been inoculated and were only subjected to low temperatures and subsequently kept in a humid chamber (ONFIT). The evaluation occurred on the 7th day for the pre-tests, on the 12th day for ONFIT and for approximately 3 months for the main test. All tests were performed in duplicate, the evaluations occurred through a diagrammatic scale for the disease and the latent infection (ONFIT) was evaluated by incidence of the pathogen. For statistical analysis, the R software was used and the means, when significant, were compared with Tukey (0.05%). The results showed that *C. chrysophilum* was the most aggressive pathogen, presenting the highest severity means in both experiments. The mixture of two isolates showed an intermediate behavior, while *C. nymphaeae* exhibited lower severity, with a more pronounced progression in the second experiment, carried out under milder climatic conditions. Regarding the position of the leaves on the branch, the oldest leaves (lower positions) had greater severity in the mixture of isolates, while *C. chrysophilum* stood out in intermediate positions. Although the analyses did not identify statistically significant differences between the leaf positions, the results suggest that the age of the leaves influences the manifestation of symptoms and the aggressiveness of the isolates. This work contributes to the understanding of the epidemiology of GLS.

Keywords: Glomerella leaf spot; *Colletotrichum chrysophilum*; *Colletotrichum nymphaeae*; Mixture of isolates; leaf age.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICO 1– MÉDIA DA SEVERIDADE DO PRIMEIRO PRÉ TESTE.....	25
GRÁFICO 2 – MÉDIA DE INCIDÊNCIA DO PRIMEIRO PRÉ TESTE	25
GRÁFICO 3– MÉDIA DA SEVERIDADE DO SEGUNDO PRÉ TESTE.	27
GRÁFICO 4– MÉDIA DE INCIDÊNCIA DO SEGUNDO PRÉ TESTE.....	27
GRÁFICO 5– INCIDÊNCIA DE SINAL DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP. EM FOLHAS DESTACADAS DE MACIEIRA APÓS DUAS INOCULAÇÕES.....	29
GRÁFICO 6– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DOENÇA PARA OS DOIS ENSAIOS <i>IN VIVO</i> COM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.....	31
GRÁFICO 7– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DESFOLHA PARA OS DOIS ENSAIOS <i>IN VIVO</i> COM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP.....	32
GRÁFICO 8– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DOENÇA POR POSIÇÃO DA FOLHA NO RAMO NO PRIMEIRO ENSAIO <i>IN VIVO</i> COM FOLHAS DE MACIEIRA.....	34
GRÁFICO 9– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DOENÇA POR POSIÇÃO DA FOLHA NO RAMO NO SEGUNDO ENSAIO <i>IN VIVO</i> COM FOLHAS DE MACIEIRA.....	35
TABELA 1. – CONTROLE FITOSSANITÁRIO DAS MUDAS UTILIZADAS.	19
TABELA 2 – RELAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO AO CÓDIGO ANOTADO, ESPÉCIE, ANO, ESTADO, CULTIVAR E PARTE DA PLANTA AO QUAL FOI OBTIDO.	19
TABELA 3– ÁREA ABAIXO DA CURVA DO PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) GERAL NOS DOIS ENSAIOS REALIZADOS COM MUDAS DE MACIEIRA.....	37
TABELA 4– ÁREA ABAIXO DA CURVA DO PROGRESSO DA DOENÇA POR POSIÇÃO DA FOLHA NO RAMO NOS DOIS ENSAIOS REALIZADOS COM MUDAS DE MACIEIRA.....	37
FIGURA 1 – SINTOMA DE MFG EM FOLHA (A), EM FRUTO (B), E ESPORULAÇÃO DE <i>COLLETOTRICHUM</i> SPP. (C).....	15

FIGURA 2– ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA.	21
FIGURA 3– SEVERIDADE DE MFG DO PRIMEIRO ENSAIO DO PRIMEIRO PRÉ TESTE.....	26
FIGURA 4– SEVERIDADE DE MFG DO SEGUNDO PRÉ TESTE.....	28
QUADRO 1- ESPÉCIES DE <i>COLLETOTRICHUM</i> CAPAZES DE CAUSAR MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA.....	16

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

MFG – Mancha Folliar de Glomerella.

BDA– Batata Dextrose Ágar.

BOD– Biochemical Oxygen Demand.

DIC– Delineamento Inteiramente Casualizado.

PA– Princípio Ativo.

NPK– Nitrogênio, Fósforo e Potássio.

SC– Santa Catarina.

PR– Paraná.

RS– Rio Grande do Sul.

EUA– Estados Unidos da América

AACPD– Área Abaixo da Curva do Progresso da Doença.

CGPD– Curva Geral do Progresso da Doença.

ONFIT– Overnight Freezing Incubation Technique.

LEMID– Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas.

Et al– E outros.

L/Ha- Litros por hectare.

mm– Milímetros.

CV– Coeficiente de variação.

%– Porcentagem.

®– Marca registrada.

Ø– Diâmetro

°C– Graus celsius

β– Beta.

+– Soma.

/– Divisão.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 A CULTURA DA MACIEIRA.....	12
2.2 MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA.....	14
2.2.1 Sintomatologia e Etiologia.....	14
2.2.2 Epidemiologia da doença	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CONDUÇÃO DAS PLANTAS DE MACIEIRA.....	18
3.2 ENSAIOS <i>EX VIVO</i> COM FOLHAS DESTACADAS DE MACIEIRA	19
3.3 VERIFICAÇÃO DA INFECÇÃO LATENTE PELO MÉTODO ONFIT.....	21
3.4 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> COM MUDAS DE MACIEIRA.....	22
3.4.1 Análise dos dados	23
4 RESULTADOS	24
4.1 ENSAIO <i>EX VIVO</i> COM FOLHAS DESTACADAS DE MACIEIRA	24
4.1.1 Primeiro pré teste	24
4.1.2 Segundo pré teste	26
4.2 ENSAIO ONFIT	28
4.3 ENSAIO <i>IN VIVO</i> COM MUDAS DE MACIEIRA	29
4.3.1 Análise Descritiva	29
4.3.1.1 Curva Geral do Progresso da Doença por Posição da Folha no Ramo.....	33
4.3.2 Análise Estatística	36
5 DISCUSSÃO	38
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

A maçã (*Malus domestica* Borkh) é a fruta de clima temperado mais consumida no mundo, destacando-se por sua grande relevância socioeconômica, ao gerar empregos e contribuir para a economia. Além disso, é reconhecida pelos benefícios que oferece à saúde dos consumidores (FAORO, 2022).

O país que mais produz maçã é a China, seguido por Estados Unidos da América e Turquia (FAORO, 2023). O Brasil por sua vez, ocupa o 11º lugar no ranking mundial de produção (IBGE, 2022). Historicamente, o Brasil começou a produzir maçã em escala comercial na década de 1970, aliado a implementação de tecnologias como porta-enxertos ananizantes, plantio em alta densidade, superação artificial da dormência e armazenamento controlado da fruta, e desde então é uma atividade consolidada no país (PETRI *et al.*, 2011).

De acordo com IBGE (2023), o Brasil produziu em 2023 cerca de 1.183.794 toneladas da fruta, em 33.358 hectares, que correspondem a um valor gerado de 2.931.988 mil reais. Santa Catarina é o estado que mais produz a fruta, seguido por Rio Grande do Sul, Paraná, Minas Gerais e São Paulo (IBGE, 2023). A cultivar ‘Gala’ é a mais plantada, e caracterizada por ser suscetível a problemas fitossanitários que acometem a cultura e diminuem a produtividade, entre eles, a principal doença de verão, mancha foliar de *Glomerella* (MFG) ou também chamada mancha foliar da Gala (MOREIRA *et al.*, 2019).

A MFG é causada por espécies de *Colletotrichum* spp., mais comumente do complexo *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense* (CARRARO *et al.*, 2023), sendo os dois primeiros o de maior relevância (MOREIRA *et al.*, 2019). O patógeno pode infectar e causar sintoma nas folhas e frutos, nas folhas apresentam manchas irregulares de coloração marrom avermelhada que evoluem para lesões necróticas, e nos frutos, apresentam uma grande quantidade de pequenas pontuações de cor marrom claro, que não evolui para uma podridão (HAMADA *et al.*, 2019). A epidemia da doença se inicia com a sobrevivência do inóculo de uma safra para outra, esta sobrevivência pode se dar através de qualquer tecido vegetal vivo como em flores, galhos e brotos dormentes, e ainda, de folhas caídas no solo e frutos mumificados que se mantem na área no período em que a planta esta dormente (inverno), assim que a planta começa a brotar (primavera), o inóculo que sobreviveu irá infecta tecidos

saudáveis e se disseminar pelo pomar (HAMADA *et al.*, 2020; HAMADA e MAY DE MIO 2017).

O curto período de incubação da doença e a falta de produtos curativos tornam o manejo da doença no campo difícil, sendo feito principalmente com o uso de produtos químicos de ação preventiva com pulverizações calendarizadas (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

Conhecer a espécie causadora da doença nos diferentes locais de cultivo é importante para definir melhor as estratégias de manejo. Existem diferenças em relação a agressividade e também sensibilidade aos fungicidas (Moreira *et al.*, 2019).

Diversas pesquisas são direcionadas a esta problemática, o que contribui para o entendimento do manejo da doença em campo (ARAÚJO *et al.*, 2017), dentre elas, um estudo sobre a dispersão e distribuição da doença no dossel da planta foi realizado por Hamada *et al* (2019) e mostrou que o inóculo inicia na parte mais baixa da planta, mas a doença se distribui aleatoriamente por toda a copa com o desenvolvimento da epidemia.

Existem relatos da relação da epidemia com a desfolha (HAMADA *et al.*, 2019), mas os estudos sobre o tema são raros, como por exemplo a interferência da idade da folha e suscetibilidade do patógeno ainda não foram plenamente estudados. Outro aspecto interessante no estudo para entender a epidemiologia da doença, é a relação que existe entre as espécies inoculadas, pois, assim como há diferença na agressividade das espécies, conforme visto por Moreira, Peres e May De Mio (2018), pode haver diferença em relação a expressão do sintoma ao longo do tempo, quando uma ou mais espécies são inoculadas em combinação e separadamente.

Neste contexto, o presente estudo teve o objetivo de avaliar o progresso temporal da mancha foliar de *Glomerella* em folhas de diferentes idades da cultivar 'Gala', inoculadas com *Colletotrichum chrysophilum* e *Colletotrichum nymphaeae* de maneira isolada e em mistura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A macieira é uma das frutíferas de clima temperado mais cultivadas no mundo, destacando-se por sua relevância histórica, econômica e produtiva. No Brasil, a produção é centralizada na região Sul, com cultivares predominantemente sendo Gala e Fuji. No entanto, os desafios como a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) comprometem a produtividade, especialmente em condições adequadas ao fungo *Colletotrichum* spp. Essa revisão aborda aspectos da cultura da macieira, histórico, produtividade e características da MFG, incluindo sua epidemiologia, sintomatologia e manejo.

2.1 A CULTURA DA MACIEIRA

A macieira (*Malus x domestica* Borkh.) pertence à família Rosaceae (RICCE *et al.*, 2018). Do ponto de vista botânico, é uma planta perene de folhas caducas que entra em dormência durante o inverno, exigindo um acúmulo de horas de frio adequado para induzir a brotação na primavera. A frutificação efetiva requer polinização cruzada, resultando em fruto do tipo climatérico, arredondado e de coloração avermelhada (PETRI, 2008).

2.1.1 Histórico

A história da evolução da maçã cultivada foi elucidada através de estudos que utilizaram marcadores moleculares para interferências evolutivas, complementados por evidências arqueológicas coletadas em expedições de campo. Esses estudos indicam que a primeira macieira, *Malus sieversii* (Ldb.) Roem, teve sua origem nas montanhas Tian Shan, na Ásia Central, por volta de 6.500 a.C. Posteriormente, *M. sieversii* passou por processos de hibridização e introgressão genética com outras espécies enquanto era comercializada ao longo da 'Rota da Seda' que passava da Ásia para a Europa, permitindo interações com *Malus baccata* (L.) Borkh. na Sibéria, *Malus orientalis* Uglitz. no Cáucaso e *Malus sylvestris* Mill. na Europa (CORNILLE *et al.*, 2014).

A maçã chegou às Américas durante os séculos XVI e XVII e, ao longo dos séculos seguintes, tornou-se uma das frutíferas mais cultivadas mundialmente, graças

à expansão e ao desenvolvimento contínuo de sua exploração (DE LA PEÑA-ARMADA e MATEOS-APARICIO, 2022).

No Brasil, os primeiros relatos sobre a macieira datam no início do século XX. O primeiro registro de cultivo ocorreu na região de Indaial, no estado de Santa Catarina, com a cultivar Bismark, no entanto, foi em 1926 na região de Valinhos, no estado de São Paulo, que houve o primeiro registro de comercialização, com a cultivar Ohio Beauty (PETRI *et al.*, 2009). Com o reconhecimento do potencial da cultura no país, a adesão dos agricultores aumentou, impulsionada pela criação de centros de pesquisa e incentivos estaduais com projetos e legislação que facilitaram sua expansão. Esse desenvolvimento consolidou três polos de produção no Brasil: Santa Catarina com as cidades de Fraiburgo e São Joaquim, Rio Grande do Sul com a cidade de Vacaria e Paraná com a cidade de Palmas – as regiões mais frias encontradas na porção Sul (PETRI *et al.*, 2011).

2.1.2 Produtividade

A produção brasileira de maçã aumentou significativamente, passando de 44 mil toneladas em 1970 para 314 mil toneladas em 1980, evidenciando a crescente consolidação do fruto (SEAGRI, 2010), neste período, o país passou a ser autossuficiente no abastecimento local da fruta, e em 1998 passou a exportá-la (PETRI *et al.*, 2011). Os estados que mais produzem no país são Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que alternam a liderança do ranking conforme o ano, seguido pelo Paraná. Segundo estimativa feita pelo IBGE, na safra 2023/2024 foram produzidas cerca de 1.183.988 toneladas, sendo Santa Catarina o principal estado responsável, contribuindo com a quantidade de 593.140 toneladas de maçã e valor de produção de 1.565.693 mil reais, os municípios que elevam estes indicadores são principalmente São Joaquim, Bom Jardim da Serra, Urupema, Monte Carlo e Fraiburgo (IBGE, 2024).

As cultivares sofreram sucessivas mudanças, passando de Golden Delicious, Starkinson, Blackjon e Melrose plantadas no início, para Gala e Fuji com seus clones Royal Gala, Imperial Gala, Maxi Gala, Fuji Suprema e Fuji Seleta (PETRI *et al.*, 2011). Atualmente na região sul do Brasil, as principais cultivares plantadas são Gala e Fuji, por terem boa aceitabilidade do mercado consumidor que leva em conta aparência e sabor do fruto (KVITSCHAL *et al.*, 2023), e 95% de toda produção brasileira provém de clones dessas duas cultivares (KIST, 2015). Outra característica

ligada a elas, é a susceptibilidade a diversas doenças fúngicas, como sarna (*Venturia inaequalis*, Cke. Wint.) em regiões de altitude maior, e podridão amarga e mancha foliar de glomerella (*Colletotrichum* spp.) para cv. Gala, em regiões de altitude menor, que possuem temperaturas mais elevadas e verões úmidos (KVITSCHAL *et al.*, 2023). A mancha foliar de glomerella se tornou uma problemática a ser enfrentada pelos produtores, devido a seu rápido aumento dos danos econômicos causados no pomar (FURLAN *et al.*, 2010; DENARDI *et al.*, 2015).

2.2 MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

A mancha foliar de Glomerella (MFG) ou mancha foliar da 'Gala', é considerada a principal doença de verão no Brasil. Em regiões onde seu desenvolvimento é favorável, pode acometer as folhas e frutos de macieira, afetando a produtividade do pomar (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Esta doença começou a ser relatada na literatura global entre as décadas de 1950 e 1960, sendo uma mancha foliar associada a cultivar Golden Delicious e causando desfolha na cultura (SUTTON & SANHUEZA, 1998). Estudos mais recentes mostram que em alta pressão de inóculo a doença pode incidir por toda a planta e causar desfolha superior a 75% (ARAÚJO, *et al.*, 2017), reduzindo 50% da produtividade ou até causar perda total (SANHUEZA *et al.*, 2003).

Nas regiões marginais ao clima temperado e em pomares onde o plantio é mais adensado, observa-se um aumento na incidência da doença (HAMADA *et al.*, 2017). As cultivares com maior susceptibilidade são do grupo Gala e seus clones (ARAÚJO, *et al.*, 2017).

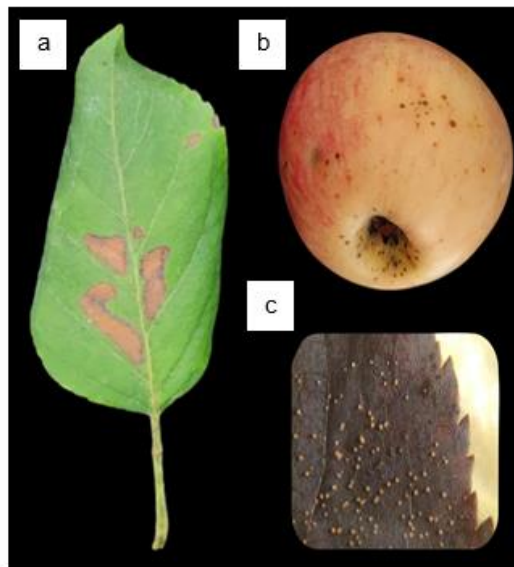
2.2.1 Sintomatologia e Etiologia

Os sintomas iniciais da MFG nas folhas, surgem no segundo dia após a infecção do patógeno, são lesões irregulares de coloração vermelho-púrpura que evoluem para lesões necróticas entre o sétimo e décimo dia. Neste período o tecido foliar desidrata, se torna completamente marrom ou amarelado e ocorre a desfolha (MOREIRA *et al.*, 2019 & VELHO *et al.*, 2018). A perda de folhas impacta diretamente no acúmulo de reservas da planta, que por consequência diminui a energia disponível

para as próximas brotações, impactando diretamente na produtividade das safras subsequentes (ARAÚJO, *et al.*, 2016).

Em frutos, os sintomas são caracterizados por apresentarem um grande número de lesões com coloração marrom-claras e levemente deprimidas, de tamanho variando de 1 a 3 mm, que não aumentam com o tempo e não evoluem para uma podridão (WANG *et al.*, 2012). O sintoma também pode ser observado nos ramos verdes, com lesões longitudinais de cor marrom clara que se tornam corticentas e com borda saliente (KATSURAYAMA e BONETI, 2009).

FIGURA 1 – SINTOMA DE MFG EM FOLHA (a), EM FRUTO (b), E ESPORULAÇÃO DE *Colletotrichum* spp. (c)



FONTE: A autora (2024)

As espécies de *Colletotrichum* estão frequentemente associadas a várias doenças em culturas de interesse agrônômico. Uma única espécie pode infectar diferentes hospedeiros, assim como um único hospedeiro pode ser infectado por várias espécies (TRKULJA *et al.*, 2024; MOREIRA *et al.*, 2019). Estudos mostram que a mancha foliar de *Glomerella* é causada principalmente pelos gêneros *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. boninense* (VELHO *et al.*, 2018).

Em um levantamento recente, Trkulja *et al.*, (2024) identificaram espécies de *Colletotrichum* capazes de infectar folhas de macieira e causar MFG em diversas regiões do mundo (Tabela X). *C. fructicola* pertence ao complexo *C. gloeosporioides*,

e é a espécie com maior predominância em Santa Catarina (VELHO *et al.*, 2018), enquanto que no Rio Grande do Sul e no Paraná a espécie de maior predominância é *C. nymphaeae*, que pertence ao complexo *C. acutatum* (MOREIRA *et al.*, 2019).

QUADRO 1- ESPÉCIES DE *Colletotrichum* CAPAZES DE CAUSAR MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA

Complexo	Espécie
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Colletotrichum tropicale</i> <i>Colletotrichum siamense</i> <i>Glomerella cingulata</i> <i>Colletotrichum fructicola</i> <i>Colletotrichum chrysophilum</i> <i>Colletotrichum asianum</i>
<i>C. acutatum</i>	<i>Colletotrichum alienum</i> <i>Colletotrichum paranaense</i> <i>Colletotrichum nymphaeae</i> <i>Colletotrichum melonis</i> <i>Colletotrichum limeticola</i> <i>Colletotrichum fioriniae</i> <i>Colletotrichum aenigma</i>
<i>C. boninense</i>	<i>Colletotrichum karsti</i>

FONTE: Trkulja *et al.*, (2024).

A identificação das espécies pode ser realizada por técnicas laboratoriais de extração de DNA, que permitem a amplificação de regiões genômicas conhecidas, como ITS, GAPDH e β -tubulina. Além disso, a identificação morfológica é feita com base em características como tamanho e forma dos conídios, presença de cerdas e escleródios, coloração, taxa de crescimento em meio de cultura e presença de teleomorfos (VELHO *et al.*, 2018). Conhecer a espécie causadora da doença é essencial, pois elas variam em agressividade e frequência de ocorrência.

As espécies mais agressivas tendem a aumentar sua frequência no pomar e, por meio da reprodução sexuada, podem gerar indivíduos com genótipos variados (CISNE *et al.*, 2017). Isso impacta diretamente o manejo da doença, considerando que há relatos de *Colletotrichum* spp. com redução na susceptibilidade a fungicidas comumente utilizados para o controle da MFG. Por exemplo, o tiofanato metílico é eficaz contra *C. gloeosporioides*, mas não contra *C. acutatum*, enquanto as

estrobilurinas mostram perda de eficiência para alguns isolados de *Colletotrichum* (ARAÚJO *et al.*, 2017).

2.2.2 Epidemiologia da doença

O inóculo primário sobrevive no pomar de forma dormente, no interior do tecido vegetal de gemas, cancrios, folhas caídas ao solo e frutos mumificados de safras anteriores, da macieira, ou, de culturas que se localizam na proximidade. Além disso, o inóculo primário também pode chegar ao pomar através de vetores, como por exemplo pela contaminação de mãos, equipamentos, maquinário e insetos. Os conídios de *Colletotrichum* spp. são envoltos por uma massa mucilaginosa constituída de açúcares e proteínas, capaz de nutrir o patógeno e proteger da dessecação (HAMADA e MAY DE MIO, 2017).

Para que o inóculo seja disseminado pelo pomar é necessário que haja estímulo sobre a massa mucilaginosa, como por exemplo da gota de chuva, que irá dissolver a mucilagem e deixar os conídios livres para infectar o tecido vegetal (AMORIM e PASCHOLATI, 2018). Esses conídios atingem principalmente o terço inferior e interior da copa das árvores (EMBRAPA, 2002; HAMADA *et al.*, 2019).

A colonização inicial de *Colletotrichum* spp. ocorre em aproximadamente duas horas após o contato do patógeno com o tecido vegetal, quando os conídios começam a emitir o tubo germinativo. Entre seis e dezoito horas, forma-se o apressório, uma estrutura localizada na extremidade do tubo germinativo que se fixa e penetra no tecido vegetal por meio do *peg* de penetração (BROOK, 1977) Após essa penetração, as hifas primárias se desenvolvem nos poros basais e infectam as células epidérmicas. Em seguida, a vesícula e as hifas primárias intracelulares promovem a formação de hifas secundárias, que se tornam mais estreitas e se espalham por todo o tecido do hospedeiro, causando lesões necróticas (KATSURAYAMA e BONETI (1999).

No Brasil, a doença ocorre com mais frequência em regiões marginais ao clima temperado e em pomares mais adensados, onde o clima quente e chuvoso favorece o desenvolvimento do patógeno. Nessas condições, temperaturas acima de 24°C, associadas à alta umidade e ao molhamento foliar de oito horas, são fatores favoráveis para desencadear a epidemia no pomar (HAMADA e MAY DE MIO, 2017). Katsurayama e Boneti (1999), atribuíram que a temperatura ótima para o fungo

infectar, varia de acordo com o período mínimo de molhamento foliar. A umidade é a condição climatológica considerada indispensável para haver incidência da doença e aumento de severidade, pois sem ela o fungo é incapaz de germinar seus esporos e realizar a penetração (CARRARO *et al.*, 2022).

A doença geralmente aparece nos meses de novembro e dezembro, quando as temperaturas aumentam naturalmente; entretanto, em períodos sem chuvas os sintomas tendem a surgir apenas em janeiro. O inverso também ocorre, em anos com chuvas antecipadas em outubro, os sintomas podem ser notados já nas flores (SANHUEZA *et al.*, 2003). Denardi *et al.*, (2015) apontam que o vigor excessivo das plantas e altos níveis de nitrogênio estimulam o surgimento de MFG, especialmente em pomares situados em baixadas com exposição ao Sul.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi conduzido na Universidade Federal do Paraná (UFPR), no Laboratório de Epidemiologia para Manejo Integrado de Doenças de Plantas (LEMID).

3.1 CONDUÇÃO DAS PLANTAS DE MACIEIRA

Mudas de aproximadamente 1,5 metros de altura foram produzidas em viveiro comercial no estado do Paraná, constituídas de porta enxerto da cultivar 'M9' e copa da cultivar 'Gala'.

Antes do plantio, fez-se a limpeza das raízes mais grosseiras e desidratadas, para acomodar corretamente as plantas nos vasos de 5 litros, em seguida, os vasos foram preenchidos com terra e substrato na proporção 1:1 até a borda. As plantas permaneceram em casa de vegetação com as condições controladas através da irrigação por aspersão, com temperatura de 25°C e umidade relativa do ar em 85%.

Enquanto as plantas se desenvolviam, houve controle de plantas daninhas e controle fitossanitário com defensivos químicos. Após a montagem dos ensaios, somente controle biológico e manual foram utilizados. Os vasos receberam adubação de 10 gramas de NPK (5-20-10) após 3 semanas do plantio. Na TABELA 1, estão descritos os produtos utilizados para o controle fitossanitário.

TABELA 1. – CONTROLE FITOSSANITÁRIO DAS MUDAS UTILIZADAS.

Produto	P. A.	Dose (L/Ha)	Alvo
Água + detergente	–	–	Pulgão e cochonilha
Abamex ®	Abamectina	0,5	Ácaro
Abamex ®	Abamectina	0,5	Ácaro
Oberon ®	Espiromesifeno	0,1	Ácaro
Oberon ®	Espiromesifeno	0,1	Ácaro
Spical C ®	<i>Neoseiulus californicus</i>	–	Ácaro
Boveril ®	<i>Beauveria bassiana</i>	–	Ácaro

FONTE: A autora (2024).

3.2 ENSAIOS EX VIVO COM FOLHAS DESTACADAS DE MACIEIRA

Para estes ensaios foram escolhidas as espécies do patógeno selecionadas de acordo com as mais frequentes em regiões brasileiras de produção de maçã, *C. chrysophilum* e *C. nymphaeae* e na Tabela 1 são descritas as características de cada isolado, incluindo a espécie, a cultura de origem, o ano de coleta do material e a parte da planta de onde foi obtido.

TABELA 2 – RELAÇÃO DOS ISOLADOS QUANTO AO CÓDIGO, ESPÉCIE, ANO, ESTADO, CULTIVAR E PARTE DA PLANTA AO QUAL FOI OBTIDO.

Código	Espécie	Ano	Estado	Cultivar	Parte da planta
MdCn-89	<i>C. nymphaeae</i>	2016	SC	Gala	Folha
MdCn-142	<i>C. nymphaeae</i>	2011	PR	Gala	Folha
MdCc-110	<i>C. chrysophilum</i>	2017	PR	Eva	Fruto de raleio
MdCc-33	<i>C. chrysophilum</i>	2010	RS	Gala	Folha

FONTE – Moreira (2019).

Os isolados foram repicados em placas de Petri contendo meio nutritivo BDA (batata, dextrose e ágar), e incubados em BOD com temperatura de 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo de 12 horas, por 7 dias.

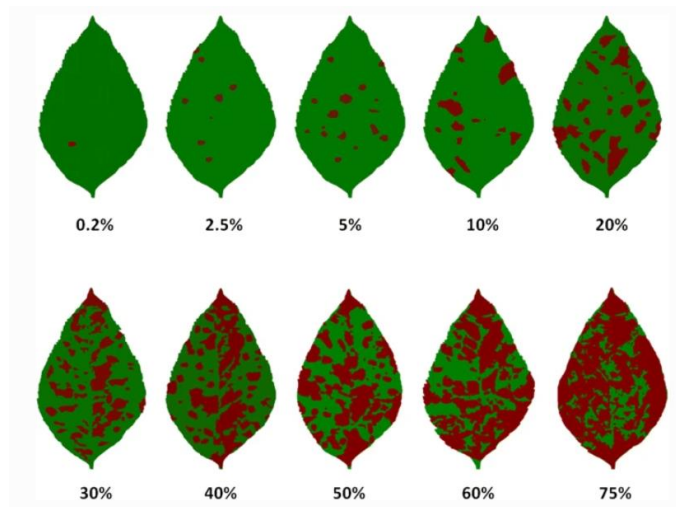
O ensaio *ex vivo* foi realizado a fim de selecionar os isolados para realização do ensaio principal. O delineamento experimental escolhido foi inteiramente casualizado, com cinco tratamentos, compostos por: i) MdcC-110 ii) MdCc-33, iii) MdCn-89SC, iv) MdCn-142 e v) Água destilada como testemunha, e quatro repetições contendo três folhas cada, totalizando 12 folhas por tratamento.

Folhas completamente expandidas, localizadas na porção mediana dos ramos, foram destacadas das mudas de 'Gala' descritas no item 3.1. Em seguida, foram desinfestadas em hipoclorito de sódio a 0,5% por 1 minuto, e lavadas três vezes com água destilada. Após a secagem, as folhas foram inoculadas utilizando aerógrafo (modelo alpha Arprex®, bico 0,03mm) na superfície abaxial com uma suspensão de inóculo ajustada por meio de câmara Neubauer, para 1×10^4 conídios/mL, e foram acomodadas sobre tela em recipientes do tipo gerbox.

O fundo do gerbox foi preenchido com papel filtro umedecido, e as tampas foram igualmente umedecidas e seladas com filme plástico para formar uma câmara úmida. O ensaio foi mantido em uma câmara de crescimento Conviron a 25°C (\pm 2°C) com fotoperíodo de 12 horas. A avaliação da severidade de MFG (% de área doente) foi realizada após 7 dias. O mesmo procedimento foi repetido em um segundo ensaio, a fim de confirmar a agressividade de MdCc-33 e MdCn-142 de maneira isolada e em mistura. Ambos os ensaios foram realizados em duplicata.

Os sintomas observados nas folhas foram avaliados por meio de escala de severidade proposta por Moreira *et al.*, (2019).

FIGURA 2– ESCALA DIAGRAMÁTICA PARA MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA.



FONTE: Moreira *et al* (2019).

A análise estatística foi realizada por meio do software RStudio® (versão 4.3.0, R Core Team, 2023), onde os dados foram submetidos a ANOVA e teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 0,05% de significância. Os pressupostos da ANOVA foram conferidos utilizando análise de Shapiro-Wilk para normalidade e Levene para homogeneidade.

3.3 VERIFICAÇÃO DA INFECÇÃO LATENTE PELO MÉTODO ONFIT

Após a segunda inoculação das mudas de macieira (item 3.3), foi realizado a verificação da infecção latente dos isolados, por meio de overnight freezing incubation technique (ONFIT) adaptado de Borve e Stensvand (2016). O delineamento experimental foi composto pelos mesmos quatro tratamentos e seis repetições da seção anterior, e em cada repetição foram utilizadas duas folhas, totalizando 12 folhas por tratamento.

Duas folhas por planta foram destacadas e desinfestadas na sequência de álcool 70%, hipoclorito de sódio a 1,0% e lavadas três vezes com água destilada, por um minuto em cada etapa. Posteriormente, as folhas foram congeladas em freezer a -20°C por 5 horas. Após este período, as folhas foram transferidas para recipientes do tipo gerbox e permaneceram mantidas com umidade e no escuro a 25°C. A avaliação foi realizada no 12º dia, observando a olho nu e com o auxílio de lupa quando

necessário, as esporulações alaranjadas de *Colletotrichum* spp. (FIGURA 1 (b)), e com isso, foram plotados gráficos de incidência.

3.4 ENSAIOS *IN VIVO* COM MUDAS DE MACIEIRA

O ensaio *in vivo* foi realizado para avaliar a severidade de mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e o progresso temporal da doença de acordo com a idade das folhas. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, composto por quatro tratamentos: i) Isolado MdCc-33, ii) Isolado MdCn-142, iii) Mistura das duas espécies dos referidos isolados, e iv) Água destilada como testemunha, e 6 repetições, ramo marcado na planta contendo 10 folhas, totalizando 60 folhas por tratamento.

Cada ramo contendo 10 folhas completamente expandidas foi marcado em ambas as extremidades, para delimitar as folhas que seriam avaliadas conforme sua posição, da folha mais velha (posição 1) à folha mais nova (posição 10). Foram realizadas quatro inoculações: a primeira com uma suspensão ajustada para 1×10^4 conídios/mL em dois ramos por planta, e as três seguintes com uma suspensão ajustada para 1×10^5 conídios/mL em quatro ramos por planta, com intervalos entre 15 e 25 dias para as três primeiras e trinta dias para a última inoculação. As inoculações foram realizadas respeitando o momento do dia com temperatura mais amena de acordo com as seguintes datas: Ensaio 1- 17/ janeiro, 1/ fevereiro, 18/ março e 18/ abril; Ensaio 2- 2/ março, 18/março, 3/abril e 7/maio.

Aproximadamente 5 mL da suspensão foi aplicada nas superfícies adaxial e abaxial das folhas, utilizando um aerógrafo (modelo alpha Arprex®, bico 0,03mm). Os ramos foram cobertos por sacos plásticos previamente umedecidos e amarrados na base do ramo, formando uma câmara úmida que permaneceu por 72 horas. Para verificar a viabilidade do inóculo em germinar, as suspensões foram pulverizadas em placas de Petri contendo meio Ágar-Água e foram mantidas no local, após 72 horas. A seguir, a germinação foi interrompida com lactofenol de Amann e foram contados os primeiros 100 conídios encontrados na placa, considerando germinados àqueles com tubo germinativo de tamanho 2x maior que o conídio.

O ensaio foi monitorado diariamente para identificar o dia em que os primeiros sintomas de MFG surgiram e a avaliação da incidência, número de folhas com sintoma

no total de folhas e da severidade, seguindo escala diagramática (Moreira *et al.*, 2019), ocorreu a cada 2 ou 3 dias, durante aproximadamente três meses.

3.4.1 Análise dos dados

A partir das severidades coletadas, foi realizado o cálculo da área a baixo da curva do progresso da doença (AACPD) no Microsoft Excel (versão 2021), aplicando a fórmula de Campbell & Madden (1990), que soma a área dos trapézios formados pela curva do progresso da doença:

$$AACPD = \sum \frac{y_i + y_{i+1}}{2} x(t_{i+1} - t_i)$$

Essa fórmula considera a média da severidade $((y_i + y_{i+1})/2)$ entre dois tempos consecutivos multiplicada pelo intervalo de tempo entre eles $(t_{i+1} - t_i)$, e soma os valores ao longo de todas as avaliações. O resultado reflete a evolução acumulada da doença ao longo do tempo.

A análise estatística foi realizada através do Software R (versão 4.3.0, R Core Team, 2023). Os dados foram transformados duas vezes, a primeira somando 1,0 a todos os resultados, para não permitir valores nulos, e a segunda de acordo com método Box-Cox (Box e Cox 1964), para atender a pelo menos um dos pressupostos da ANOVA e poder considerar o teste de separação de médias feito por Tukey a 0,05%. A normalidade foi analisada por Shapiro-Wilk e homogeneidade por Lavene.

4 RESULTADOS

Os resultados do presente estudo foram separados em três seções, onde a primeira (4.1) corresponde aos testes *ex vivo* com folhas destacadas, a segunda (4.2) corresponde ao ensaio ONFIT para verificação da infecção latente e a terceira (4.3) corresponde ao ensaio *in vivo* com as mudas de macieira.

4.1 ENSAIO *EX VIVO* COM FOLHAS DESTACADAS DE MACIEIRA

Para cada folha avaliada, foi atribuída uma porcentagem de severidade de mancha foliar de *Glomerella*, avaliando não só o tecido sintomático, mas também a área de tecido sadio pois, cada folha apresenta um tamanho diferente. Os dados de severidade foram tabelados e com isso feito a média por tratamento e análise estatística das médias.

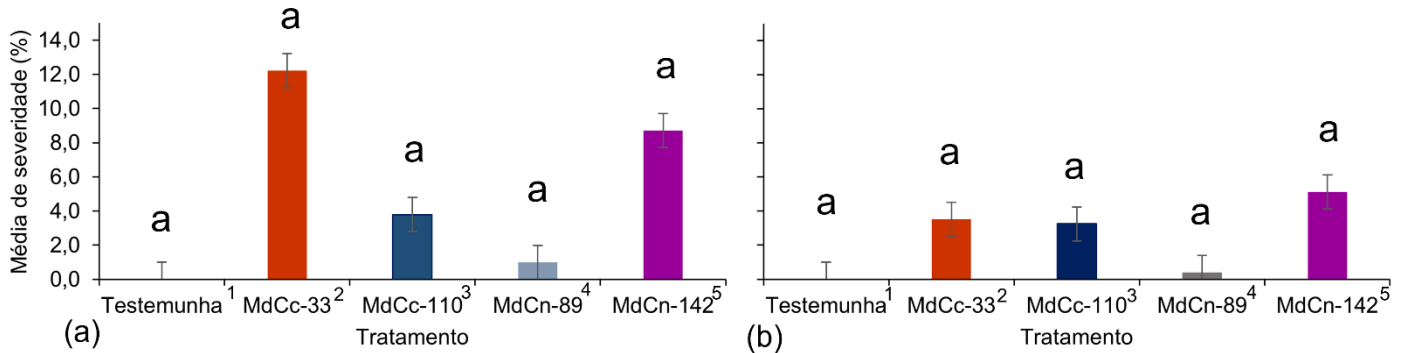
4.1.1 Primeiro pré teste

As médias de severidade dos tratamentos foram representadas no GRÁFICO 1, onde (a) corresponde ao primeiro ensaio e (b) ao segundo ensaio. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os tratamentos em ambos os ensaios.

No primeiro ensaio do pré-teste, o tratamento MdCc-33 apresentou a maior média de severidade, com 12,2%, seguido pelos tratamentos MdCn-142 (8,7%), MdCc-110 (3,8%) e MdCn-89 (1,0%). Já na repetição do ensaio, o tratamento com maior média de severidade foi MdCn-142, com 5,1%, seguido por MdCc-33 (3,5%), MdCc-110 (3,3%) e MdCn-89 (0,4%). O tratamento utilizado como controle onde foi borrifado água, não apresentou sintoma em nenhum dos ensaios.

Em ambos os ensaios, os dois tratamentos com maior severidade foram MdCc-33 e MdCn-142, correspondendo às espécies *Colletotrichum chrysophilum* e *Colletotrichum nymphaeae*, respectivamente.

GRÁFICO 1– MÉDIA DA SEVERIDADE DO PRIMEIRO PRÉ TESTE.

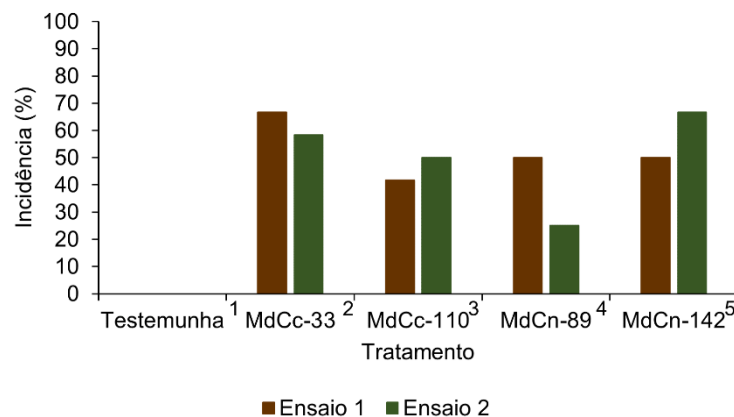


FONTE: A autora (2024).

Nota: (a) Primeiro ensaio, (b) Repetição, ¹Água destilada, ² e ³ Isolados de *Colletotrichum chrysophilum*, ⁴ e ⁵ Isolados de *Colletotrichum nymphaeae*.

Em relação a incidência (GRÁFICO 2), a maior quantidade de folhas que expressaram sintomas de MFG foram aquelas inoculadas com os isolados MdCc-33 e MdCn-142, exceto no segundo ensaio onde MdCn-142 e MdCn-89 se igualaram com incidência de 50%. Com base nesses resultados, os isolados MdCc-33 e MdCn-142 foram selecionadas para dar continuidade ao estudo, apesar da análise estatística de severidade não mostrar diferenças devido a variabilidade nas repetições.

GRÁFICO 2 – MÉDIA DE INCIDÊNCIA DO PRIMEIRO PRÉ TESTE

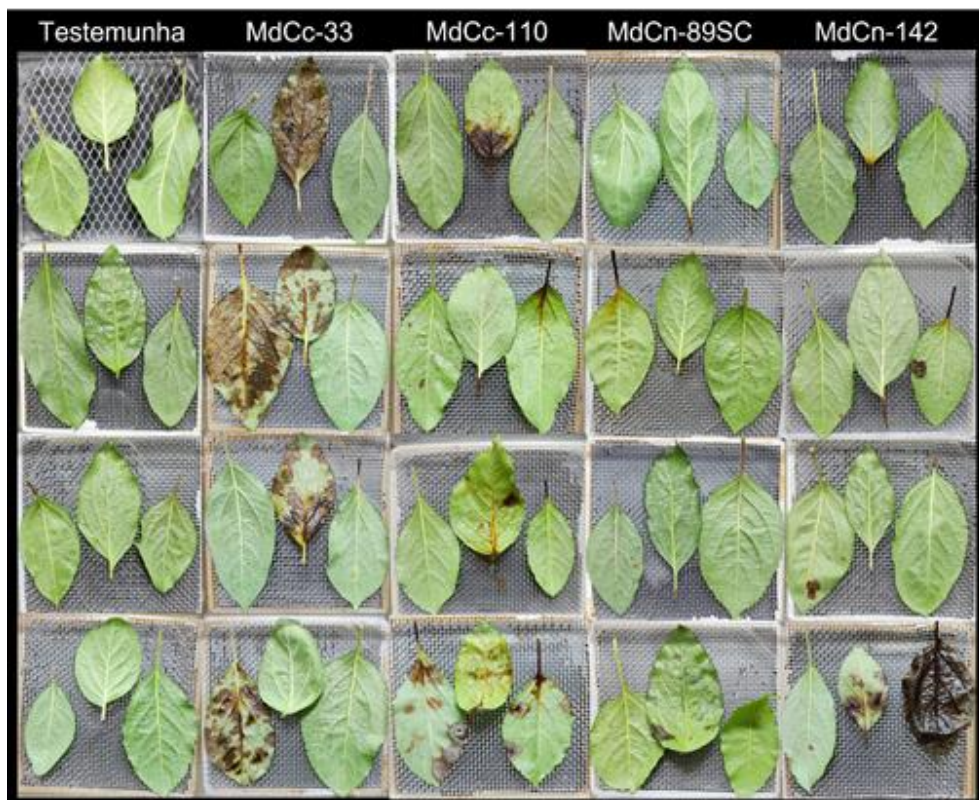


FONTE: A autora (2024).

Nota: ¹Água destilada, ² e ³ Isolados de *Colletotrichum chrysophilum*, ⁴ e ⁵ Isolados de *Colletotrichum nymphaeae*.

A FIGURA 3 ilustra o primeiro ensaio do primeiro pré teste. Observa-se na parte abaxial das folhas, a diferença na severidade entre os tratamentos, onde a testemunha permaneceu sem nenhum sintoma e MdCc-33 cuja a espécie é *Colletotrichum chrysophilum*, apresentou um maior número de folhas sintomáticas e com maior severidade.

FIGURA 3– SEVERIDADE DE MFG DO PRIMEIRO ENSAIO DO PRIMEIRO PRÉ TESTE.



FONTE: A autora (2024).

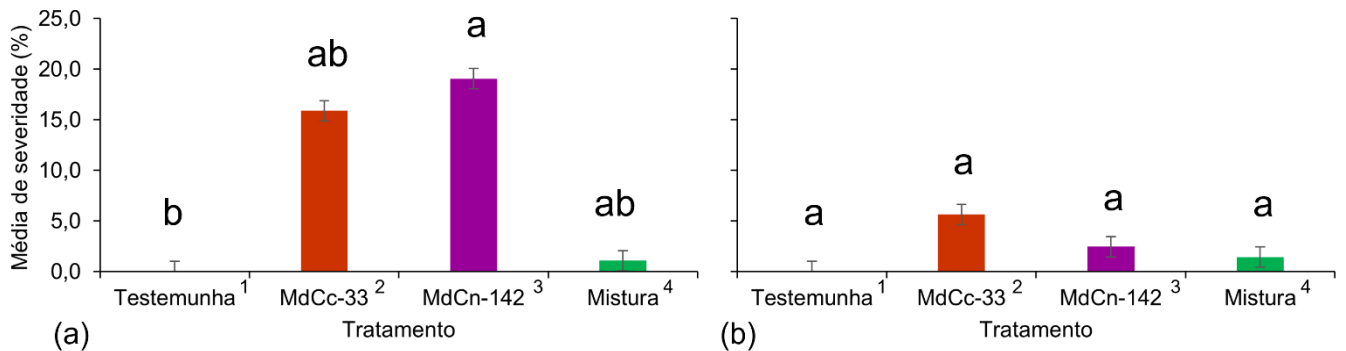
4.1.2 Segundo pré teste

As médias de severidade dos tratamentos estão representadas no GRÁFICO 3, onde (a) corresponde ao primeiro ensaio e (b) ao segundo ensaio. Estatisticamente, não houve diferença significativa entre os tratamentos em ambos os ensaios.

No primeiro ensaio, o tratamento MdCn-142 obteve a maior média de severidade observada (19,0%), seguido pelo tratamento MdCc-33 (15,9%). Porém, quando os tratamentos foram misturados houve uma diminuição na média de

severidade (1,1%). O mesmo ocorreu no segundo ensaio, onde o tratamento ‘Mistura’ obteve média de severidade cerca de 1,0 e 4,2% menor quando comparado ao tratamento MdCn-142 e MdCc-33, respectivamente. Ao contrário do primeiro ensaio, neste, o tratamento com maior média de severidade foi MdCc-33 (5,6%), seguido por MdCn-142 (2,5%).

GRÁFICO 3– MÉDIA DA SEVERIDADE DO SEGUNDO PRÉ TESTE.

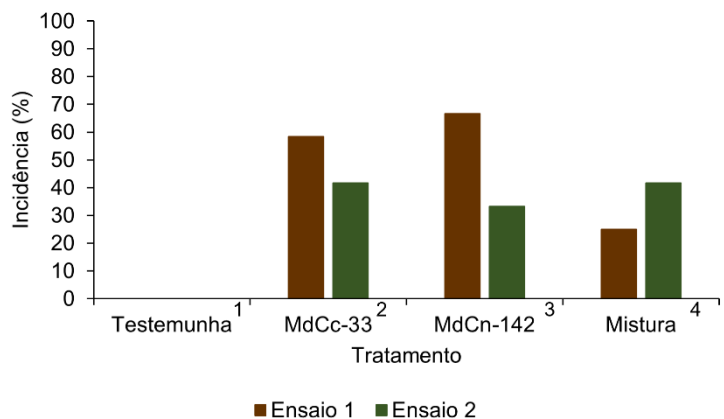


FONTE: A autora (2024).

Nota: (a) Primeiro ensaio, (b) Repetição, ¹Água destilada, ² Isolado *Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴ Mistura dos dois isolados.

No GRÁFICO 4 é possível observar que MdCn-142 foi o tratamento com maior média de incidência no primeiro ensaio, sendo 8,4 e 41,7% maior que MdCc-33 e a Mistura dos isolados, respectivamente. Já no segundo ensaio, MdCc33 e a Mistura dos isolados igualaram suas médias de incidência, enquanto MdCn-142 obteve média 8,4% menor.

GRÁFICO 4– MÉDIA DE INCIDÊNCIA DO SEGUNDO PRÉ TESTE.

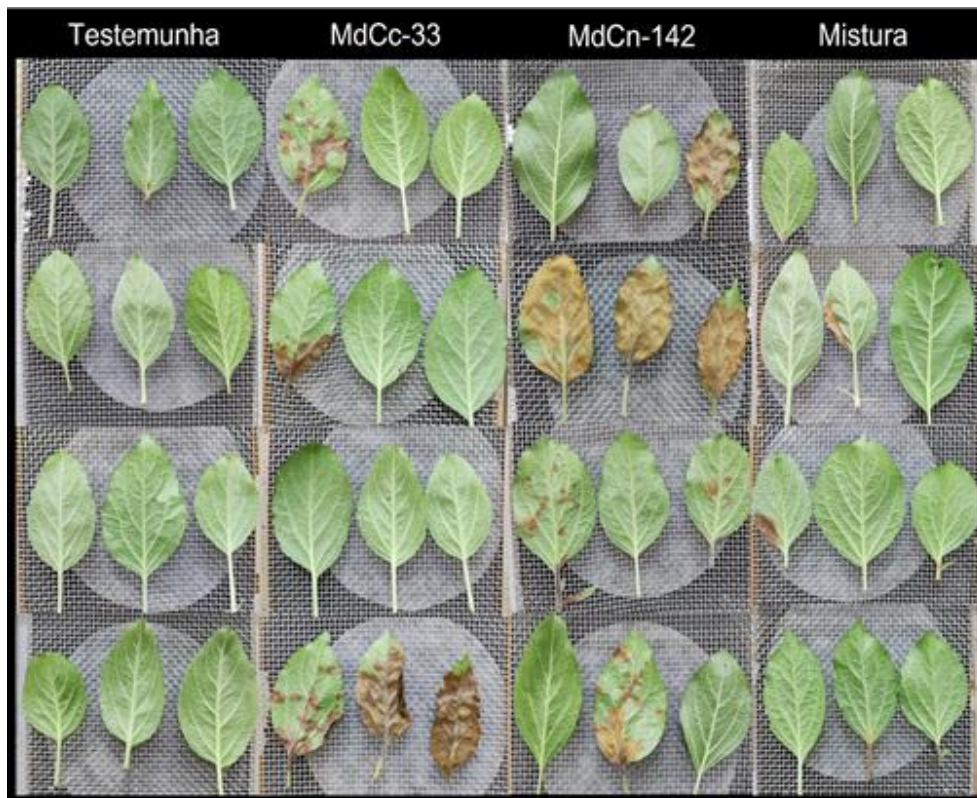


FONTE: A autora (2024).

Nota: ¹Água destilada, ² Isolado *Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴ Mistura dos dois isolados.

A FIGURA 4 ilustra os sintomas de MFG do primeiro ensaio. Observa-se com destaque que o tratamento Mistura apresentou pouco ou nenhum sintoma, enquanto que MdCc-33 e MdCn-142 foram capazes de necrosar a área foliar com mais facilidade e em maior quantidade de folhas afetadas.

FIGURA 4– SEVERIDADE DE MFG DO SEGUNDO PRÉ TESTE.



FONTE: A autora (2024).

4.2 ENSAIO ONFIT

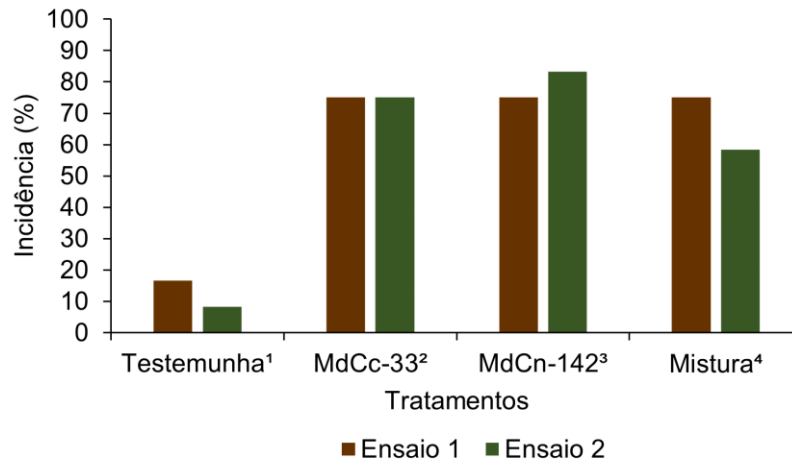
No GRÁFICO 5, estão expostos as médias obtidas para a incidência de esporulação de *Colletotrichum* spp., nas folhas destacadas das mudas que haviam sido inoculadas, de acordo com cada tratamento.

Por mais que as folhas não apresentassem sintoma após duas inoculações, é possível observado através do GRÁFICO 5, o sucesso dos inóculos na infecção do tecido vegetal. No primeiro ensaio, com exceção da Testemunha, todos os

tratamentos apresentaram 75% de incidência. No segundo ensaio, MdCn-142 apresentou a maior incidência, 83,33%.

As Testemunhas compostas por água destilada, obtiveram 16,66 e 8,33% de incidência no primeiro e segundo ensaio, respectivamente.

GRÁFICO 5– INCIDÊNCIA DE SINAL DE *Colletotrichum* spp. EM FOLHAS DESTACADAS DE MACIEIRA APÓS DUAS INOCULAÇÕES.



FONTE: A autora (2024).

Nota: (a) Primeiro ensaio, (b) Repetição, ¹Água destilada, e ² Isolado *Colletotrichum chrysophilum*, ³ Isolado *Colletotrichum nymphaeae* e ⁴ Mistura dos isoaldos.

4.3 ENSAIO *IN VIVO* COM MUDAS DE MACIEIRA

4.3.1 Análise Descritiva

No GRÁFICO 4, encontram-se as curvas gerais do progresso da doença (CGPD) para o primeiro (a) e segundo (b) ensaio, com mudas de macieira. O eixo “x” representa o tempo a partir das primeiras observações dos sintomas, e o eixo “y” representa a média das severidades observadas em cada tratamento. O tempo “1” no gráfico, representa os primeiros sintomas observados, e foram respectivamente após a primeira inoculação em 40 dias para o ensaio 1 e após 18 dias para o ensaio 2.

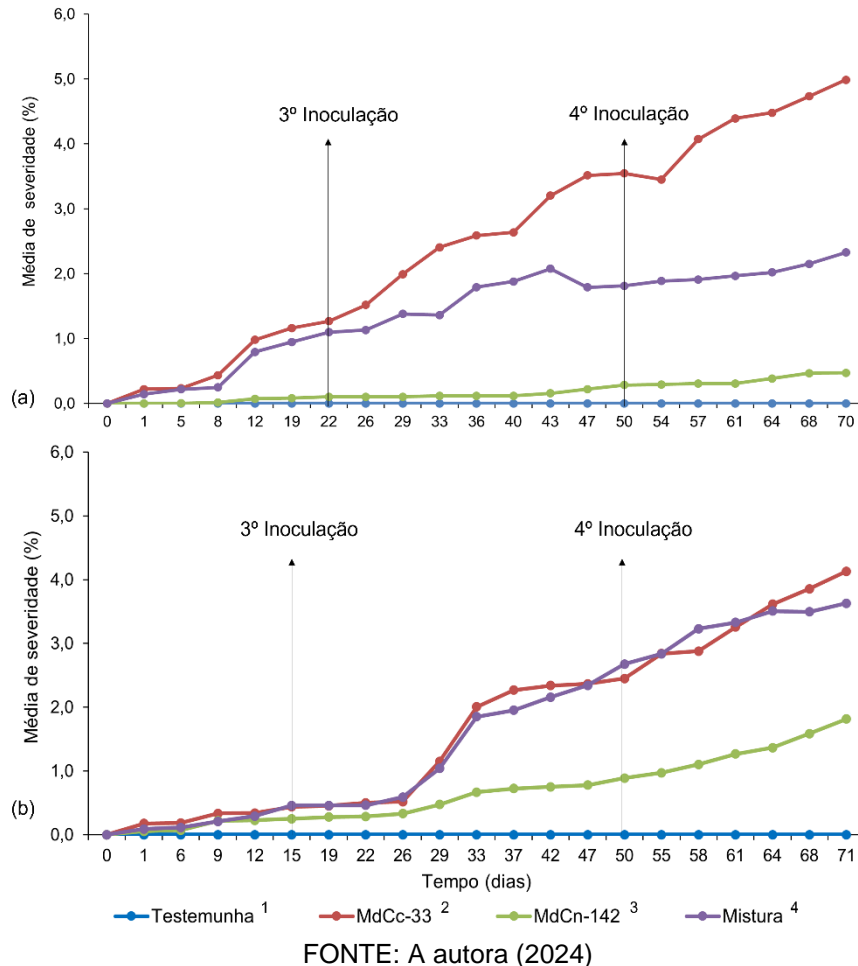
Os tratamentos apresentam CGPD distintas. Em ambos os ensaios as folhas inoculadas com suspensão de esporos começaram a apresentar sintoma de mancha foliar de *Glomerella* a partir da segunda inoculação, sendo que o primeiro levou um intervalo de dias maior, enquanto a testemunha (água destilada), manteve severidade

nula ao longo do período avaliado. Em algumas situações a severidade média de determinado tratamento diminuiu, indicando que houve a queda da folha.

No primeiro ensaio, o tratamento MdCc-33 (*Colletotrichum chrysophilum*), obteve maiores médias de severidade quando comparado ao tratamento MdCn-142 (*Colletotrichum nymphaeae*) e a Mistura das duas espécies, ao longo do tempo. Inicialmente, MdCc-33 e a Mistura das espécies aumentaram de severidade de maneira semelhante, entretanto, no quarto dia após a terceira (22º dia) e quarta inoculação (50º dia), a severidade de MdCc-33 se diferenciou, elevando sua CGPD em relação a Mistura. MdCn-142 foi o tratamento inoculado com fungo que apresentou menor severidade durante todo o ensaio. Ao final, as severidades médias de MdCc-33, Mistura e MdCn-142 foram 4,99, 2,33 e 0,47%, respectivamente.

No segundo ensaio, os tratamentos levaram mais tempo para aumentar de severidade, sendo necessários 11 dias após a terceira inoculação (15º dia) para observar uma elevação na CGPD. Desde então, os tratamentos MdCc-33 e Mistura das duas espécies progrediram de maneira semelhante durante todo o período avaliado. Ao final do ensaio, MdCc-33 alcançou média de severidade 0,5% maior que o tratamento composto pela Mistura dos dois isolados, 4,13 e 3,63 %, respectivamente. MdCn-142 manteve sua média inferior durante todo o período avaliado, porém em comparação ao primeiro ensaio, obteve médias maiores, chegando ao final do ensaio com 1,82%.

GRÁFICO 6– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DOENÇA PARA OS DOIS ENSAIOS *in vivo* COM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM *Colletotrichum* spp.



Nota: (a)primeiro ensaio, (b)segundo ensaio, ¹água destilada, ²*Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*.

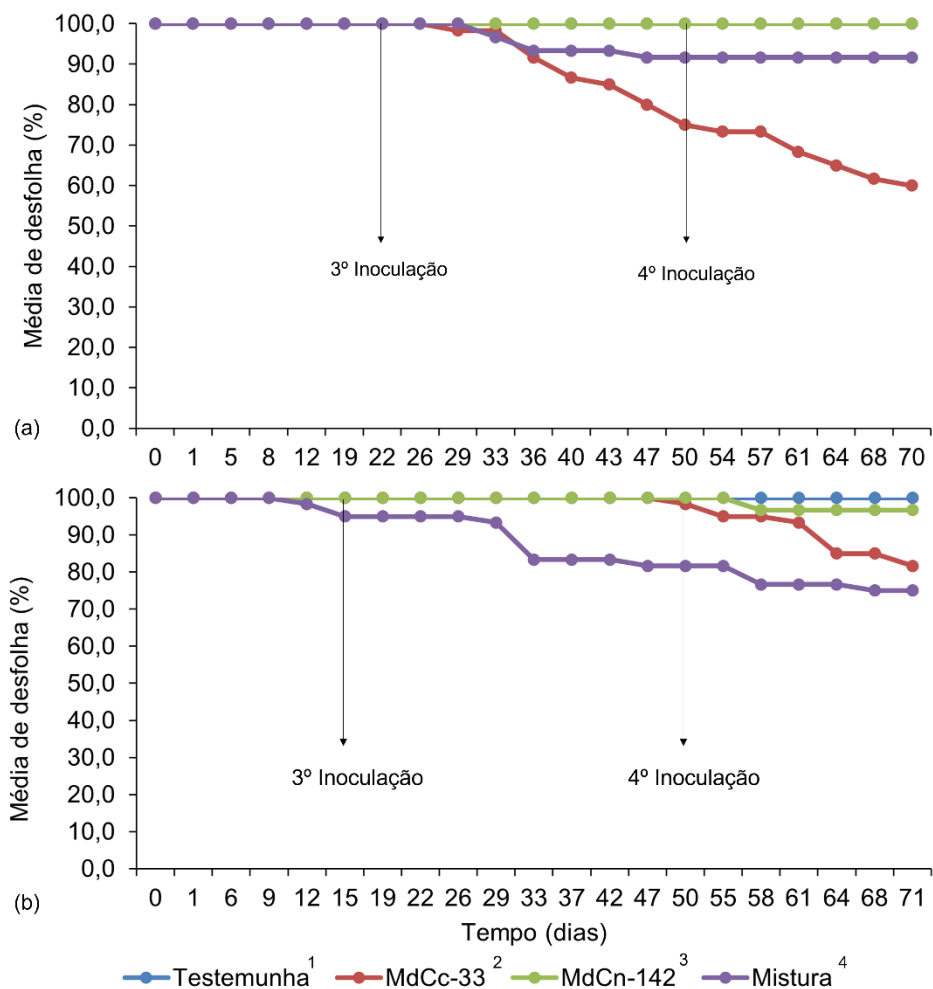
No GRÁFICO 7, estão presentes as curvas gerais do progresso da desfolha no primeiro (a) e segundo (b) ensaio. O eixo “x” representa os dias de avaliação dos ensaios e o eixo “y” representa a média do progresso da desfolha.

O progresso da desfolha ocorreu de maneira diferente nos dois ensaios. No primeiro ensaio, a queda das folhas iniciou no 7º dia após a terceira inoculação (29º dia) para o tratamento MdCc-33, e no 11º dia após a terceira inoculação (33º dia) para o tratamento composto pela Mistura das espécies. O progresso da desfolha ocorreu de maneira mais acentuada para MdCc-33 em relação aos outros tratamentos, passando de 1,7% no início para 40% no final do ensaio. A Mistura manteve desfolha

de 8,3% do dia 47 até o dia 70. Não foram observadas desfolhas para os tratamentos testemunha e MdcCn-142.

No segundo ensaio, a desfolha ocorreu de maneira mais precoce, iniciando antes da terceira inoculação. Neste ensaio o tratamento com maior porcentagem de desfolha do começo até o fim, foi a Mistura das duas espécies, que iniciou com 1,7% no 12º dia e terminou com 25%. MdCc-33 por sua vez, desfolhou de maneira mais tardia e abrupta em comparação com a Mistura, iniciou com 1,7% no 50º dia e terminou com 18,3% de desfolha. MdCn-142 causou desfolha de 3,3%.

GRÁFICO 7– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DESFOLHA PARA OS DOIS ENSAIOS *in vivo* COM MUDAS DE MACIEIRA INOCULADAS COM *Colletotrichum* spp.



FONTE: A autora (2024)

Nota: (a)primeiro ensaio, (b)segundo ensaio, ¹água destilada, ²*Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*.

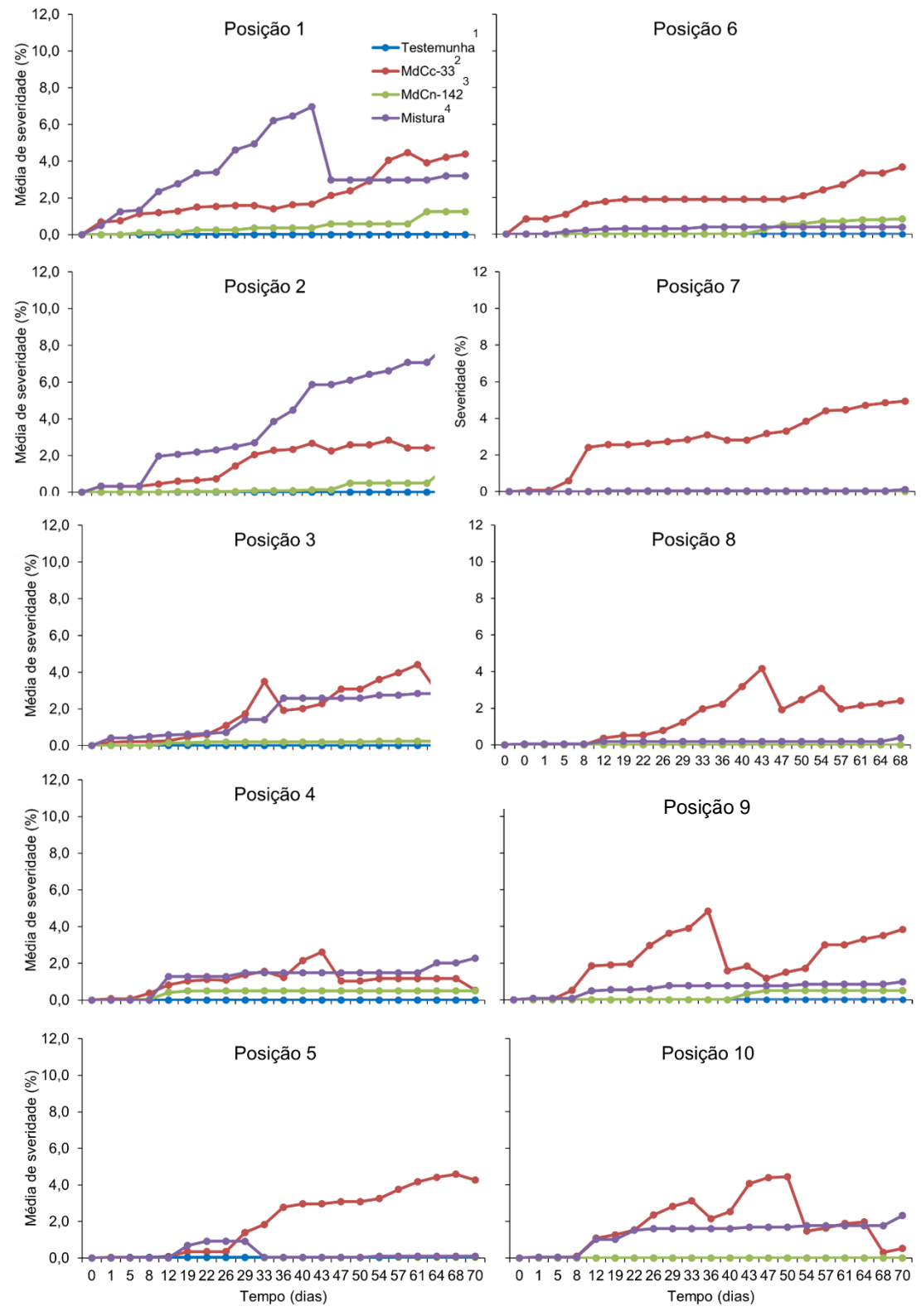
4.3.1.1 Curva Geral do Progresso da Doença por Posição da Folha no Ramo.

Nos GRÁFICOS 8 e 9, estão presentes as curvas gerais do progresso da doença em diferentes posições da folha no ramo, no primeiro e segundo ensaio, respectivamente. É possível analisar nesses gráficos, um maior detalhamento do que foi exposto na seção 4.3.1. Em algumas situações a severidade média de determinado tratamento e posição diminuiu, indicando que houve a queda da folha.

As curvas de severidade por tratamento se comportaram de maneira diferente em cada posição. No primeiro ensaio, o tratamento MdCc-33 exibiu maior severidade na maioria das posições, com destaque para as posições 6, 7 e 8. Em contraste a isso, MdCn-142 exibiu progressão lenta e reduzida em todas as posições observadas. O tratamento composto pela Mistura das duas espécies demonstrou comportamento dependente da posição, pois, nas posições 1, 2 e 3 as porcentagens de severidade superaram em pelo menos um momento, as severidades do tratamento MdCc-33, enquanto no restante das posições, as porcentagens de severidade foram nulas ou próximas de zero.

No segundo ensaio, o comportamento observado para o tratamento Mistura das duas espécies se manteve, com as folhas mais velhas, representadas pelas posições 1, 2 e 3. MdCc-33 apresentou maior severidade ao longo do tempo nas posições 4, 5, 6, 7 e 8. O tratamento testemunha não apresentou sintoma da doença em nenhuma das posições observadas de ambos os ensaios.

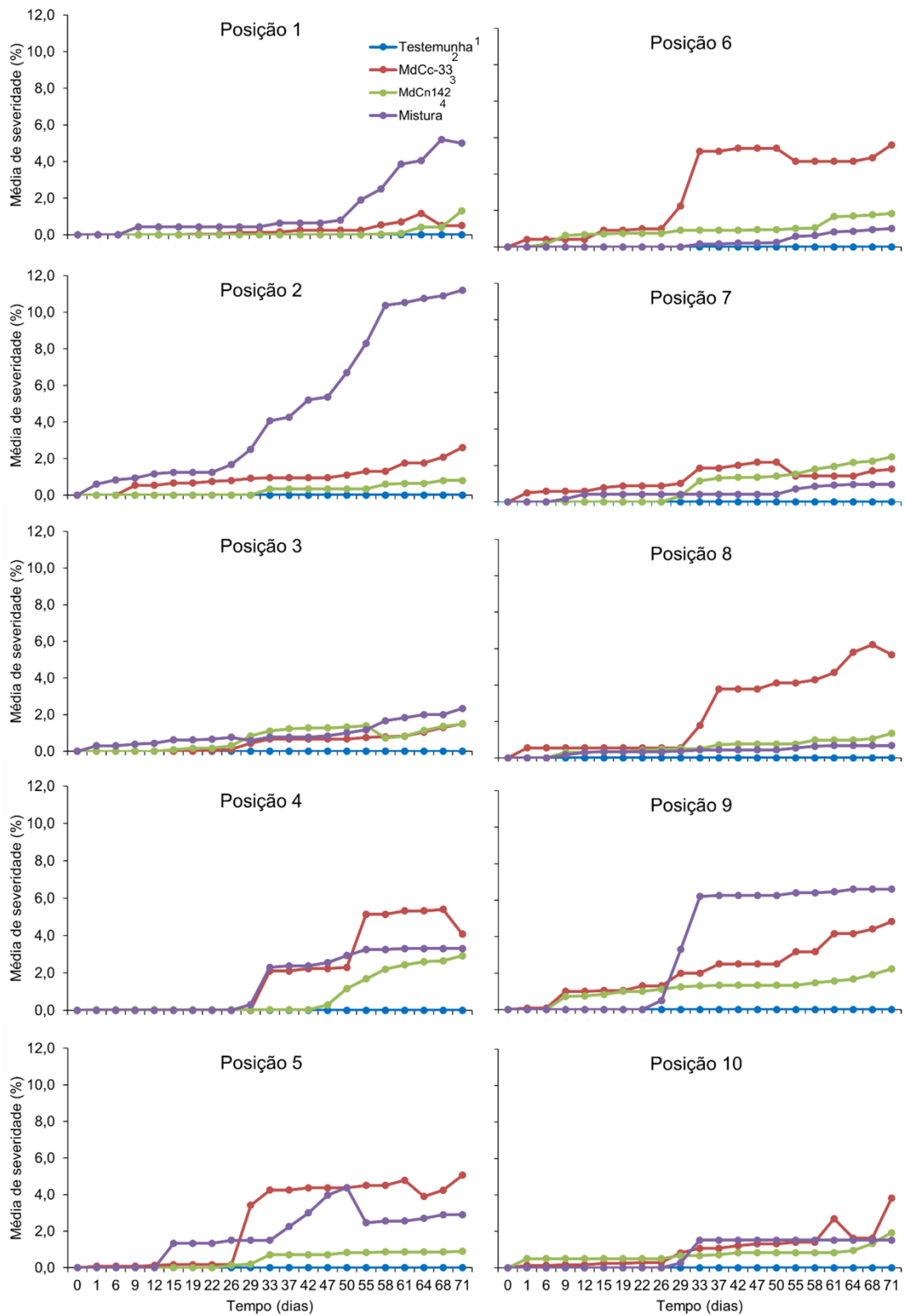
GRÁFICO 8- CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DOENÇA POR POSIÇÃO DA FOLHA NO RAMO NO PRIMEIRO ENSAIO *in vivo* COM FOLHAS DE MACIEIRA.



FONTE: A autora (2024)

Nota: ¹água destilada, ²*Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*.

GRÁFICO 9– CURVA GERAL DO PROGRESSO DA DOENÇA POR POSIÇÃO DA FOLHA NO RAMO NO SEGUNDO ENSAIO *in vivo* COM FOLHAS DE MACIEIRA



FONTE: A autora (2024).

Nota: ¹água destilada, ²*Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*.

4.3.2 Análise Estatística

A partir dos gráficos e das análises descritivas expostas na seção 4.2.1, a área abaixo da curva do progresso da doença para cada tratamento (AACPD) foi calculada e submetida às análises estatísticas. Nas TABELAS 3 e 4 encontram-se os resultados de AACPD geral e por posição da folha no ramo, respectivamente.

Na tabela 3, observa-se que o tratamento Testemunha não apresentou progresso da doença (AACPD=0,0) em ambos os ensaios. Nos tratamentos inoculados com fungo, MdCc-33 e MdCn-142, foram identificadas diferenças significativas nos valores de AACPD em relação a testemunha em ambos os ensaios.

O tratamento com MdCc-33 apresentou os maiores valores de AACPD em ambos os ensaios (170,0 no ensaio 1 e 115,3 no ensaio 2). Por outro lado, o tratamento com MdCn-142 obteve valores significativamente menores (11,9 no ensaio 1 e 44,8 no ensaio 2). O tratamento Mistura das espécies apresentou valores intermediários de AACPD, com 97,3 para o primeiro ensaio, demonstrando uma severidade da doença significativamente maior que MdCn-142, mas igual a de MdCc-33. No segundo ensaio, a Mistura obteve valor de 111,9, demonstrando ainda ser maior que o tratamento MdCn-142, mas estatisticamente igual a ele, conforme indicado pela letra “b”.

A TABELA 4 indica que não houve diferença estatística em relação a posição das folhas testadas nos dois ensaios. Em ambos os ensaios, o tratamento Mistura obteve valores de AACPD altos para as folhas mais velhas, com 238,4 e 277,0 no ensaio 1, e 108,5 e 337,3 no ensaio 2, respectivamente para as folhas 1 e 2. As maiores AACPD encontrada para MdCc-33 foram no terço superior e médio do ramo, nas posições 9 e 6, respectivamente nos ensaios. Para MdCn-142 os valores de AACPD foram distintos entre os ensaios, com valores mais elevados para as folhas mais velhas no primeiro ensaio, e valores mais elevados para as folhas mais jovens no segundo ensaio.

TABELA 3– ÁREA ABAIXO DA CURVA DO PROGRESSO DA DOENÇA (AACPD) GERAL NOS DOIS ENSAIOS REALIZADOS COM MUDAS DE MACIEIRA.

A. A. C. P. D.		
Tratamento	Ensaio 1	Ensaio 2
Testemunha ¹	0,0 a	0,0 a
MdCc-33 ²	170,0 b	115,3 c
MdCn-142 ³	11,9 c	44,8 b
Mistura ⁴	97,3 b	111,9 b

FONTE: A autora (2024).

Nota: ¹água destilada, ²*Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*.

TABELA 4– ÁREA ABAIXO DA CURVA DO PROGRESSO DA DOENÇA POR POSIÇÃO DA FOLHA NO RAMO NOS DOIS ENSAIOS REALIZADOS COM MUDAS DE MACIEIRA.

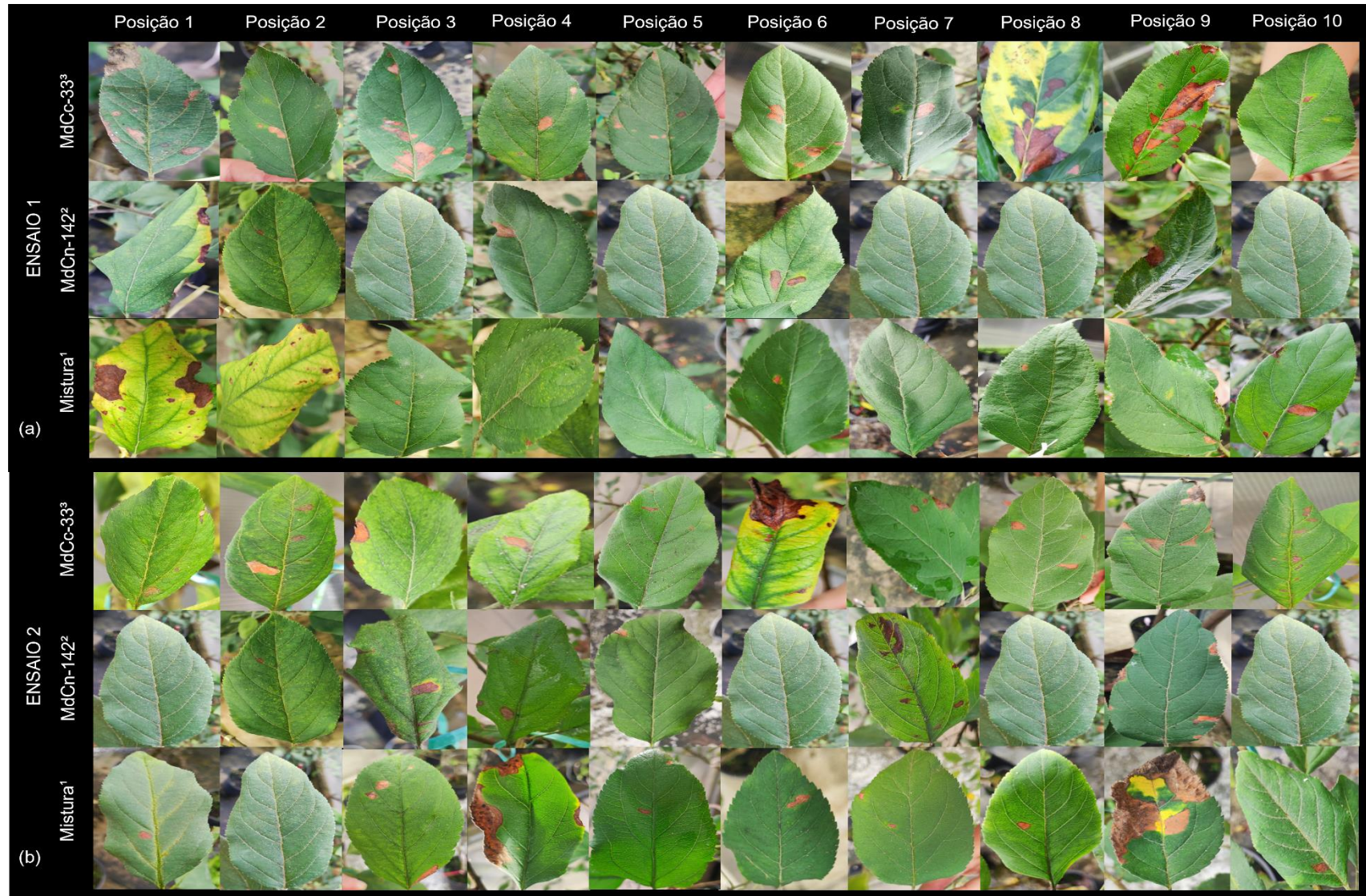
A. A. C. P. D.										
Tratamento	posição 1	posição 2	posição 3	posição 4	posição 5	posição 6	posição 7	posição 8	posição 9	posição 10
	Ensaio 1 (CV 46,9 %)									
Testemunha ¹	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
MdCc-33 ²	146,1 a	113,7 a	139,7 a	77,9 a	140,9 a	137,2 a	200,0 a	102,6 a	156,3 a	134,2 a
MdCn-142 ³	28,9 a	16,4 a	12,1 a	29,7 a	2,7 a	15,6 a	0,0 a	0,0 a	13,7 a	0,0 a
Mistura ⁴	238,4 a	277,0 a	120,9 a	89,8 a	14,9 a	20,9 a	1,9 a	10,9 a	44,4 a	94,5 a
	Ensaio 2 (CV 59,0 %)									
Testemunha ¹	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
MdCc-33 ²	18,0 a	69,2 a	34,6 a	142,7 a	190,3 a	230,8 a	94,0 a	185,4 a	153,7 a	69,2 a
MdCn-142 ³	9,9 a	18,5 a	53,2 a	50,7 a	33,0 a	65,3 a	66,0 a	42,3 a	81,5 a	51,8 a
Mistura ⁴	108,5 a	337,3 a	66,2 a	115,4 a	138,2 a	19,0 a	34,4 a	28,7 a	267,9 a	61,7 a

FONTE: A autora (2024)

Nota: ¹água destilada, ²*Colletotrichum chrysophilum*, ³*Colletotrichum nymphaeae* e ⁴*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*.

A FIGURA 5 ilustra os sintomas que foram observados ao longo das avaliações do primeiro (a) e segundo (b) ensaio, estão representados por uma folha de cada posição e independente da repetição. As folhas inoculadas com água não apresentaram sintoma típico de MFG. Observa-se pela figura que, MdCc-33 apresentou maior severidade em ambos os ensaios, seguido pela Mistura e MdCn-142. A severidade de MFG causada por MdCn-142 foi relativamente maior nas folhas do segundo ensaio, comparando este mesmo tratamento ao primeiro ensaio.

FIGURA 5– SINTOMAS DE MFG OBSERVADOS NO PRIMEIRO (a) E SEGUNDO (b) ENSAIO COM MUDAS DE MACIEIRA.



FONTE: A autora (2024).

Nota: ¹ *Colletotrichum chrysophilum*, ² *Colletotrichum nymphaeae* e ³ *Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*

5 DISCUSSÃO

Espécies de *Colletotrichum* são amplamente relatadas causando doenças em frutíferas como pêsego, caqui, uva e maçã. Na macieira, as espécies que pertencem aos complexos *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum gloeosporioides* são as mais frequentes associadas a doença de mancha foliar de glomerella (MFG) (JAYAWARDENA *et al.*, 2021 e CARRARO *et al.*, 2023).

Diversos autores relataram, em seus estudos, a ocorrência de diversas espécies causando MFG, deixando claro o predomínio dos dois complexos mencionados. Velho *et al.*, (2018) identificaram que 94% dos 19 isolados obtidos a partir de folhas sintomáticas de MFG dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do sul, foram *C. chrysophilum*. Moreira *et al.*, (2019) identificaram 207 isolados obtidos de diferentes partes da planta nas regiões de São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul e relataram que 114 pertenciam ao complexo *C. acutatum* e 93 pertenciam ao complexo *C. gloeosporioides*. Isto é relatado também fora no Brasil, como no sudeste dos EUA (TAYLOR, 1971), leste da China (WANG *et al.*, 2012) e Uruguai (CASANOVA *et al.*, 2017).

O aspecto de frequência é diferente de agressividade, pois, como visto neste estudo, *Colletotrichum chrysophilum* (*Cc*) que pertence ao complexo *C. gloeosporioides*, atingiu valores de severidade maiores quando comparado a *Colletotrichum nymphaeae* (*Cn*), que pertence ao complexo *C. acutatum*, embora ambos sejam frequentemente encontrados causando a doença.

Andrello *et al* (2024) compararam a virulência de isolados de *Cc* e *Cn* em folhas de macieira com diferentes metodologias, os autores relataram que foi necessário realizar microferimentos com pó de carborudum na superfície foliar de folhas destacadas para que *Cn* expressasse sintoma necrótico, diferente do que foi visto no presente estudo, onde *Cn* foi capaz de expressar sintoma necrótico sem o ferimento. Por outro lado, *Cc* manifestou o sintoma independentemente da presença do microferimento, se mostrando mais agressivo, assim como visto no presente estudo. Semelhante a isso, Moreira *et al.*, (2020) mostrou que os isolados de *C. nymphaeae* apresentaram diferentes agressividades quando inoculados em pêsegos com e sem ferimento, evidenciando a variação que pode ocorrer entre os isolados e em específico para esta espécie.

Um amplo estudo realizado nos EUA para esclarecer a etiologia da MFG mostrou que nenhum dos 11 isolados de *Colletotrichum* spp. (6 *C. gloeosporioides* e 5 *C. acutatum*) foram patogênicos quando inoculados em folhas de mudas de macieira, estes autores apontam que há semelhança em características do DNA de isolados que infectam folhas e frutas, e por isso, atribuem que os genótipos de *Colletotrichum* spp. que infectam a folha, surgiram a partir de populações endêmicas que causavam infecção na fruta (GONZÁLEZ, SUTTON e CORRELL, 2006). Assim, é possível observar que além da diferença na agressividade entre isolados de mesma espécie, o ambiente em que eles estão inseridos estimulam uma resposta diferente em relação ao desenvolvimento da doença.

Semelhante ao observado neste trabalho, Hamada *et al.*, (2019) observaram 4 isolados de *C.n* causando MFG em folhas da cultivar 'Gala', com incidência média de 44 a 50%. Estes autores também realizaram inoculação em frutos sem fermento e destacam que os sintomas de MFG nas folhas surgiram mais rápido do que os sintomas nos frutos, pois, a constituição da superfície do tecido foliar e da fruta, tem influência na germinação dos esporos e conseqüentemente surgimento dos sintomas. Avaliar os frutos é importante, visto que o mesmo isolado de *Colletotrichum* spp. pode infectar frutos causando Podridão Amarga e folhas e frutos causando MFG, e se ambas as doenças estiverem presentes no pomar, podem servir de inóculo uma para outra desencadeando novas epidemias (HAMADA *et al.*, 2019; CASTELLAR, PETERMANN e MAY DE MIO, 2023).

Frutos com sintoma típico de MFG não evoluem para podridão amarga, mas isolados obtidos a partir de MFG podem causar podridão amarga quando inoculados a partir de metodologia suspensão de conídios e deposição de gota no fruto, como relatado por Castellar, Petermann e May De Mio (2023). Neste mesmo estudo mencionado, os autores relataram que frutos de tamanho 5,5cm (Ø 4) considerados mais velhos, quando inoculados pelos isolados MdCc-33 e MdCn-142 expressaram incidência de mais de 50% de MFG no campo e pouca ou nenhuma incidência da doença no laboratório, a hipótese levantada para isso está relacionada com as metodologias aplicadas, pois, no campo os frutos foram inoculados com suspensão de conídios por borrifada e no laboratório por gota. Sabendo que a infecção ocorre por meio de lenticelas e pequenos ferimentos, e que a densidade das lenticelas diminui com o crescimento do fruto, aqueles que foram inoculados no campo tiveram uma área de exposição relativamente maior, quando comparados a aqueles

inoculados no laboratório, especialmente para os frutos de diâmetro maior, que possuem densidade menor de lenticelas (CASTELLAR, PETERMANN, MAY DE MIO, 2023).

Uma extensão destes relatos pode ser aplicada a este estudo, onde viu-se que as folhas mais velhas foram mais susceptíveis a expressar sintomas de MFG quando inoculadas pela Mistura das espécies, possivelmente pela composição da superfície foliar ser diferente nestas posições, onde *Cn* pode, assim como *Cc* exercer competitividade e colonizar o tecido foliar. De acordo com Smith *et al.*, (2006), a composição da cutícula, especialmente das ceras, varia conforme a espécie e o órgão vegetal, influenciando diretamente a germinação de esporos e o desenvolvimento de apressórios.

Neste estudo, as mudas de macieira foram estressadas com a ocorrência espontânea de pulgão e de ácaro na estufa, e isto pode tê-las deixado mais sensível a infecção do patógeno pois, como relatado por Moreira *et al.*, (2020) o parênquima que serve como uma barreira física à germinação dos conídios, nas folhas estressadas apresenta um menor número de camadas do que o parênquima de folhas sem estresse, e ainda, os resultados de severidade obtidos para *Cc* e *Cn* de ambos os estudos estão de acordo, visto que Moreira *et al.*, (2020) observou sintomas visíveis a olho nu em inoculações realizadas na parte abaxial de folhas com e sem estresse, assim como neste estudo, em que as folhas foram inoculadas nas duas superfícies e por mais que não tenham sofrido estresse em níveis iguais pelos insetos, apresentaram sintomas visíveis a olho nu.

Colletotrichum chrysophilum em teste *in vitro*, germinou com uma ampla faixa de temperatura e teve sua germinação ótima nas mais elevadas, em comparação a *Colletotrichum nymphaeae*, que germinou em uma faixa mais estreita de temperatura e teve sua germinação ótima nas mais amenas (MOREIRA *et al.*, 2020). Isso pode ter influenciado no presente estudo pois, a temperatura observada nos meses do primeiro ensaio foram relativamente mais altas do que as do segundo, que ocorreram no verão e no outono, respectivamente, e aliado a isso foi observado que MdCc-33 apresentou maiores porcentagens de severidade nos dois ensaios, enquanto MdCn-142 foi mais agressivo no segundo. Embora a germinação observada em meio ágar-água de MdCn-142 tenha sido alta em todas as inoculações, a interação do hospedeiro com a planta favoreceu o isolamento em temperaturas menores, influenciando inclusive a queda das folhas no segundo ensaio.

As folhas de macieira não expressaram sintoma de MFG após duas inoculações de suspensão dos esporos, mas foi identificado o sucesso da infecção através de metodologia que quebra a barreira superficial da folha permitindo visualizar a esporulação do fungo, tal como relatado por Borge e Stensvand (2016), estes autores aplicaram metodologia semelhante em folhas de pomar experimental da Noruega e avaliaram um possível efeito da posição da folha, para isso a coleta do material se deu através de folhas localizadas no esporão de frutas e de brotos vegetativos, o resultado da incidência não demonstrou diferença significativa, indicando que *Colletotrichum* spp. sobrevive de forma assintomática igualmente em folhas por toda a árvore. A partir da segunda inoculação, a pressão de esporos exercida sobre a planta fez com que os mesmos colonizassem o tecido e causassem a necrose.

A sobrevivência do inóculo primário em folhas caídas no solo é um fator que pode contribuir para o surgimento da doença no campo (HAMADA e MAY DE MIO, 2017) pois, os esporos são mais frequentes no terço inferior da planta enquanto as taxas de MFG são maiores no terço superior, devido ao prolongamento do período de molhamento e possíveis falhas na pulverização desta região (HAMADA *et al.*, 2019).

Não foi possível observar diferença estatística em relação a AACPD entre as posições das folhas no ramo, assim como Hamada *et al.*, (2019) não observaram diferença nas posições das folhas dos brotos. Porém, é importante observar como as espécies se comportam de forma isolada e em mistura e em qual nível de severidade acometem a folha de acordo com a posição. A desfolha da planta não ocorre só em razão da doença, mas também do clima, fisiologia, nutrição e estresse (HAMADA *et al.*, 2019). Existem poucos estudos ainda, relacionando a severidade de MFG causando desfolha em relação a posição da folha, portanto, é necessário direcioná-los de modo a entender a relação que existe entre esses dois fatores.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram necessárias sucessivas inoculações para que *Colletotrichum* spp. expressasse sintoma de mancha foliar de Glomerella, por mais que todas as espécies estivessem presente de forma endofítica nas folhas. *Colletotrichum chrysophilum* foi a espécie mais agressiva na maioria dos ensaios com folhas destacadas de macieira da cultivar 'Gala', e na maioria das posições das folhas de mudas da mesma cultivar, exceto nas posições de folhas mais velhas, onde a Mistura dos dois isolados (*Colletotrichum chrysophilum* + *Colletotrichum nymphaeae*) mostrou maior severidade, entretanto, não houve diferença estatística entre posições. Para a AACPD geral, os tratamentos inoculados com fungo diferiram estatisticamente da testemunha e a Mistura dos isolados se manteve mais próxima de *C. chrysophilum* no primeiro ensaio e mais próxima de *C. nymphaeae* no segundo ensaio.

REFERÊNCIAS

- ANDRELLO, A. J.; VELHO, A. C.; SOARES, V. F.; GODOY, R.S.; FREITAS, M. B.; SANHUEZA, R. M. V.; KULCHESKI, F. R. e STADNIK, M. J. Comparative virulence of *Colletotrichum chrysophilum* and *Colletotrichum nymphaeae* on apple leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v.131, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2024.102285>
- ARAÚJO, L. et al. Podridão amarga e Mancha Foliar de *Glomerella* em macieira: etiologia e manejo. In: VII SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE FRUTICULTURA TEMPERADA EM REGIÃO SUBTROPICAL, 2017.
- ARAÚJO, L.; MEDEIROS, H. A.; PASA, M. e SILVA, F. N. Doenças da Macieira e Pereira. Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 37, n. 290, p. 61-74, 2016.
- ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J.; BORSATO, L. C.; e SANHUEZA, R. M. V. Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 2, p. 148-152, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762008000200009>
- BONETI, J.I.S et al. Nova cultivar de macieira resistente à sarna (*Venturia inaequalis*) e à Mancha da Gala (*Colletotrichum* spp.). Jornal da Fruta (Caderno Especial - XI Enfrute), p. 2-2, 2009.
- BORVE, J. e STENSVAND, A. *Colletotrichum acutatum* ocorre assintomaticamente em folhas de macieira. **Eur J Plant Pathol.** v. 147, n. 4, p 943-948, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1050-3>
- BROOK, P.J. *Glomerella cingulata* and bitter rot of apple. **Agrie. Res.**, v. 20, p. 547-55, 1977.
- CARRARO, T. A.; MOREIRA, R. R., GELAIN, J.; MAY DE MIO, L. L., Etiology and epidemiology of diseases caused by *Colletotrichum* spp. In persimmon, apple, peach, and grapevine, **Revisão anual de patologia de plantas**, v.28, p-136-162, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.31976/0104-038321v280006>
- CASANOVA, L.; HERNÁNDEZ, L.; MARTÍNEZ, E; VELHO, A.C.; ROCKENBACH, M.F.; STADNIK, M.J e MONDINO, P. First report of *Glomerella* leaf spot on apple caused by *Colletotrichum fructicola* in Uruguay. **Plant Disease**, v.101 n.5, p. 834–834, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/pdis-09-16-1320-pdn>
- CISNE, C. V. et al. Variação morfo-cultural e agressividade de *Colletotrichum fructicola* em um pomar de macieira em Fraiburgo-SC. **Agropecuária Catarinense**, v. 30, n. 1, p. 66–72, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.52945/rac.v30i1.12>
- CORNILLE, Amandine et al. The domestication and evolutionary ecology of apples. **Trends In Genetics**, v. 30, n. 2, p. 57-65, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2013.10.002>.
- DE LA LAPENA-ARMADA, R. e MATEOS-APARICIO, I. Sustainable Approaches Using Green Technologies for Apple By-Product Valorisation as A New Perspective

into the History of the Apple. **Molecules**, v. 27 n. 6937, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27206937>

DENARDI, F.; KVITSCHAL, M.V.; HAWERROTH, M.C. SCS425 Luiza, SCS426 Venice e SCS427 Elenise: Novas cultivares de macieira da Epagri para o Sul do Brasil. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE FRUTICULTURA DE CLIMA TEMPERADO, p. 96-10114º, 2015.

FAORO, I.D. (Org.) Maçãs do grupo 'Gala' no Brasil. Florianópolis: Epagri, 2022.

FURLAN, C.R.C et al. A Resistência genética dos acessos do Banco de Germoplasma de Macieira da Epagri à Mancha Foliar de Glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 2, p. 507-514, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452010000200022>

GONZÁLEZ E, SUTTON TB, CORRELL JC. Esclarecimento da etiologia da mancha foliar de Glomerella e podridão amarga da macieira causadas por *Colletotrichum* spp. com base em testes morfológicos e genéticos, moleculares e de patogenicidade. **Phytopathology**. v. 96, n. 9, p. 982-992, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/FITO-96-0982>

HAMADA, N. A. e MAY DE MIO, L. L. Survival of pathogenic *Colletotrichum* isolates on dormant buds, twigs and fallen leaves of apple trees in commercial orchards. **ISHS**. v.72, p. 158-165, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17660/th2017/72.3.5>

HAMADA, N. A. et al. Pathogen dispersal and Glomerella leaf spot progress within apple canopy in Brazil. **Plant Disease**, v. 103, n. 12, p. 3209–3217, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-18-1375-RE>

HAMADA, N. A.; MOREIRA, R. R.; FIGUEIREDO, J. A. G.; MAY DE MIO, L. L. *Colletotrichum acutatum* complex isolated from apple flowers com cause bitter rot and Glomerella leaf spot. **Plant Protection**. v.79. n.3. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20190429>

JAYAWARDENA, R. S.; BHUNJUN, C.S.; HYDE, K. D.; GENTEKAKI, E. e ITTHAYAKORN, P. *Colletotrichum*: lifestyles, biology, morpho-species, species complexes and accepted species. **Mycosphere**. v.12 n.1, p.519-669, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.5943/micosfera/12/1/7>

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

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J. I. S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil. In: STADNIK, M. J. Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis/SC: Universidade Federal de Santa Catarina, p. 45-64, 2009.

KIST, B.B. Anuário brasileiro da maçã. **Revista Santa Cruz do Sul**, p. 72, 2015.
KVITSCHAL, M.V. et al. **Cultivares de macieira desenvolvidos pela Epagri**. Florianópolis: Epagri, 2023. 97p. Relatório técnico.

LEITE, R.P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A. Y. Ocorrência de mancha foliar de *Glomerella* em macieira no Estado do Paraná. Fundação Instituto Agrônômico do Paraná Informe de Pesquisa, 81, 2016.

MOREIRA, R. R.; PERES, N. A. e MAY DE MIO, L. L. *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* species complexes associated with apple in Brazil. **Plant Disease**. v.103, p. 268- 275, 2018. Disponível em: <https://doi:10.1094/pdis-07-18-1187-re>.

MOREIRA, R. R.; SILVA, G.A. e MAY DE MIO, L.L. *Colletotrichum acutatum* complex causing anthracnose on peach in Brazil. **Australasian Plant Pathology**, v. 49, p. 179–189, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13313-020-00690-z>.

MOREIRA, R.R, DUARTE, H S. S. e MAY DE MIO, L.L. Melhorando a precisão, a exatidão e a confiabilidade das estimativas de severidade da mancha foliar de *Glomerella* em folhas de macieira usando um novo conjunto de diagramas de área padrão. **Eur J Plant Pathol** 153, 975–982 (2019). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01610-0>

PETRI, J. L. Macieira. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Caçador, v. 30, n. 4, p. 875-1166, 2008. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-9452008000400001>.

PETRI, J. L., et al. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. especial, p. 48-56, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-29452011000500007>

RICCE, W. da S.; PADOLFO, C.; PASA, M. da S. Zoneamento Agroclimático. In: SEZERINO, André Amarildo (org.). Sistema de Produção para a cultura da macieira em Santa Catarina. Florianópolis: Epagri, 2018. Cap. 2. p. 21-24.

SANHUEZA, R.M.V. Produção integrada de frutas, o caso da maçã no Brasil. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, p.53-59, 2003

SEZERINO, A. A. Sistema de produção para a cultura da macieira em Santa Catarina. **Florianópolis: Epagri**, v. 136, 2018

SMITH, J.A.; BLANCHETTE, R.A.; BURNES, T.A.; GILLMAN, J.H. e DAVID, A.J. Cera epicuticular e resistência à ferrugem de bolha de pinheiro branco em seleções resistentes e suscetíveis de pinheiro branco oriental (*Pinus strobus*). **Fitopatologia**. v.98, p. 171-177. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/FITO-96-017>

SUTTON, T. B. e SANHUEZA, R. M. Necrotic Leaf Blotch of Golden Delicious-*Glomerella* Leaf Spot: A Resolution of Common Names. **Plant Disease**, v. 82, n.3, p. 267-268, 1998. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.3.267>.

TRKULJA, V. et al. *Colletotrichum* Species Associated with Apple Bitter Rot and *Glomerella* Leaf Spot: a comprehensive overview. **Journal Of Fungi**, [S.L.], v. 10, n. 9, p. 660, 2024. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jof10090660>.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. et al. Doenças da Macieira. In: Manual de fitopatologia: Doenças de plantas cultivadas. 5 ed. São Paul: Agronômica Ceres, v.a. p. 485-509, 2018.

VELHO, A. C.; STADNIK, M. J.; WALLHEAD, M. Unraveling Colletotrichum species associated with Glomerella leaf spot of apple. **Tropical Plant Pathology**, [S.L.], v. 44, n. 2, p. 197-204, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s40858-018-0261-x>.

WANG, C. X.; ZHANG, Z. F.; LI, B. H. First report of Glomerella Leaf Spot of Apple Caused by *Glomerella cingulata* in China. **Plant Disease**, v.96, p. 912, 2012. Disponível em: <https://doi:10.1094/PDIS-11-11-0987-PDN>.