Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Efeito do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio na morfofisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, na indução de resistência em mangas ‘Tommy Atkins’ contra a antracnose e em características físicas e químicas desses frutos

Thiago Anchieta de Melo

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em
Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2017

Thiago Anchieta de Melo
Engenheiro Agrônomo

Efeito do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio na morfofisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, na indução de resistência em mangas ‘Tommy Atkins’ contra a antracnose e em características físicas e químicas desses frutos

Orientador:
Prof. Dr. **SÉRGIO FLORENTINO PASCHOLATI**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de concentração: Fitopatologia

Piracicaba
2017

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP**

Melo, Thiago Anchieta de

Efeito do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio na morfofisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, na indução de resistência em mangas 'Tommy Atkins' contra a antracnose e em características físicas e químicas desses frutos / Thiago Anchieta de Melo. - Piracicaba, 2017.

149 p.

Tese (Doutorado) - - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Controle alternativo 2. Proteínas-RP 3. Qualidade fisiológica 4. *Mangifera indica* 5. Celulases I. Título

DEDICATÓRIA

A Deus,
Pela oportunidade diária de ser objeto da Sua graça sem medida.

Aos meus pais,
Roger de Melo e Sílvia de Melo
Pelo apoio incondicional, amor desmedido e por serem os melhores pais desse mundo!

Aos meus irmãos,
Alexandre de Melo e Fernanda de Melo
Pelo amor que nos une, amizade e suporte ao longo de toda a minha vida!

Ao meu avô (*in memoriam*),
José Raimundo Anchieta
Que partiu dizendo a todos, com o peito cheio de orgulho, que eu havia mudado para São Paulo só
para fazer um curso. Estou de volta, vovô! O curso acabou!

À minha avó,
Rosa Maria Brito
Que sempre esteve ao meu lado, em todas as decisões da minha vida!

A Stênio Bruzaca,
Que me inunda todos os dias com amor, carinho e companheirismo!

A todos vocês, dedico.

AGRADECIMENTOS

Há muito o que agradecer, especialmente porque em mim, é clara a certeza de que ninguém faz um doutorado sozinho.

Primeiramente, agradeço a Deus pela minha vida, pelo cuidado diário e pelas oportunidades incríveis que Ele me proporciona. Eu não sei o que é sonhar e não concretizar e isso tudo acontece sob a permissão do Pai, por isso, muito obrigado.

Agradeço, especialmente, ao meu orientador, o Prof. Dr. Sérgio Florentino Pascholati, pela amizade, dedicação, confiança e por ser um exemplo de profissional e ser humano. Por mostrar, para todos os seus orientados, que podemos ser professores e pesquisadores de sucesso, sem perder valores que, mesmo não estando no Lattes, são mais importantes do que qualquer grande descoberta.

Aos meus pais, Roger de Melo e Sílvia de Melo, e aos meus irmãos, Alexandre de Melo e Fernanda de Melo, por andarem ao meu lado todos os dias, por apoiarem e respeitarem as minhas escolhas e decisões e por serem a melhor família que eu poderia ter.

Aos demais familiares, especialmente aos meus tios Marcus Anchieta, Silvana Anchieta e Celiane Anchieta, e também aos meus primos, Andrea Anchieta, Adryelle Anchieta, Felipe Anchieta, Mateus Anchieta e Lucas Anchieta, que também sempre estiveram pertinho de mim todos esses anos.

Ao Stênio Bruzaca, pelo amor leve, sem pressões, que cuida, ensina e dá forças para seguir em frente todos os dias. Amo a sua vida e muito obrigado por tudo!

Agradeço também a todos os meus amigos de São Luís, especialmente, Nestor Fonseca, Fernanda Carolina Araújo, Marcela Uli, Márcia Lustosa, Laiana Linhares, Anna Paula Pereira, Alaíne Aragão e Alessandra Gaspar. Somos amigos há mais de 10 anos e todos os dias vocês me provam que nenhuma distância diminui o que é para sempre.

À amiga e professora, Dra. Ilka Serra, por ter sido a primeira a enxergar em mim o potencial para chegar até aqui. Por todo o incentivo, apoio, confiança e pela parceria que dura até hoje, agradeço!

Agradeço à Dalilla Rezende, Simone Brand, Rafaela Roma, Silvia Blumer, Nívea Zanardo, Dayson Brandão, Victor Hugo Moura, Luiz Rafael Pinto, todos os amigos do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica, pela troca diária e amizade.

Às amigas queridas que a ESALQ me deu, Caroline Rabelo, Paula Panosso, Josi Arruda, Perla Oliveira e Aline Silva, pela troca, pelo riso fácil e por todos os momentos compartilhados juntos.

Agradeço, especialmente, à minha grande amiga de pós-graduação e de vida, Meyriele Camargo, por todos os dias em que seguramos nas mãos um do outro e seguimos em frente. Sua amizade é um dos melhores presentes dessa jornada!

À amiga de república e de vida, também maranhense, Marta Arruda, pelos momentos de troca em casa e pela oportunidade de um convívio tranquilo.

Às minhas alunas e orientandas na UEMA, Adryelle Anchieta, Thamires Sousa e Karlene Fernandes, pela ajuda na execução de boa parte das análises e pelo convívio diário no Laboratório de Fitopatologia.

Muito obrigado a todos os professores do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP, por todo o suporte ao longo desses anos.

A todos os funcionários do Departamento de Fitopatologia e Nematologia da ESALQ-USP, pelo apoio e, especialmente, à Fabiana Wolak pela eficiência, paciência e prontidão em ajudar.

Agradeço ao Prof. Dr. José de Ribamar Gusmão Araújo e à técnica, Eng^a Agrônoma, Thâmia Aranha, da UEMA, pelo apoio nas análises físico-químicas realizadas neste trabalho.

Aos professores, Dr. José Belasque, Dra. Lilian Amorim, Dr. Edson Furtado, Dr. Ângelo Jacomino, Dra. Silvia Blumer, Dra. Dalilla Rezende, Dra. Ilka Serra e às Pesquisadoras Dra. Patrícia Cia e Dra. Eliane Benato, por terem aceitado o convite para participar da minha banca de defesa e, dessa forma, contribuir para a melhoria deste trabalho.

O apoio individual de cada um de vocês foi importante em etapas distintas, mas todas essenciais, da execução deste trabalho. Por isso, mesmo sendo o meu nome que aparece na capa, aos que já são, sintam-se mais doutores e aos que não são, sintam-se hoje, doutores comigo.

Muito obrigado!

EPÍGRAFE

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”*

Arthur Schopenhauer

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
LISTA DE FIGURAS	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	19
REFERÊNCIAS	21
 2. EFEITO MORFOFISIOLÓGICO DO EXTRATO DA ALGA MARINHA <i>Ascophyllum nodosum</i> E DO FOSFITO DE POTÁSSIO SOBRE O FUNGO <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	23
Resumo	23
Abstract	23
2.1 Introdução	24
2.2. Material E Métodos	32
2.2.1. Obtenção do isolado	32
2.2.2. Avaliação do extrato da alga marinha <i>A. nodosum</i> e do fosfito de potássio sobre a morfologia do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	33
2.2.2.1. Crescimento micelial	33
2.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura do micélio	34
2.2.2.3. Determinação da massa fresca do micélio	34
2.2.2.4. Esporulação	34
2.2.2.5. Germinação e fixação do conídio	35
2.2.3. Fisiologia da hifa de <i>C. gloeosporioides</i> sob a ação do extrato da alga marinha <i>A. nodosum</i> e do fosfito de potássio	37
2.2.3.1. Efeito dos produtos sobre a condutividade elétrica da membrana plasmática	37
2.2.3.2. Conteúdo total de proteína e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase no micélio do fungo	37
2.2.3.3. Efeito do extrato de <i>A. nodosum</i> e do fosfito de potássio sobre a capacidade celulolítica do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	39
2.3. Resultados E Discussão	40
2.3.1. Avaliação do extrato da alga marinha <i>A. nodosum</i> e do fosfito de potássio sobre a morfologia do fungo <i>C. gloeosporioides</i>	40
2.3.2. Fisiologia da hifa de <i>C. gloeosporioides</i> sob a ação do extrato da alga marinha <i>A. nodosum</i> e do fosfito de potássio	48
2.4. Conclusões	56
REFERÊNCIAS	57
 3. POTENCIAL DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA MEDIADA PELO EXTRATO DA ALGA MARINHA <i>Ascophyllum nodosum</i> E PELO FOSFITO DE POTÁSSIO, APLICADA AO MANEJO DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MANGA ‘TOMMY ATKINS’	65
Resumo	65
Abstract	65
3.1. Introdução	66

3.2. Material E Métodos	72
3.2.1. Obtenção dos isolados.....	72
3.2.2. Avaliação da severidade da doença em mangas tratadas e inoculadas com o patógeno	73
3.2.3. Testes bioquímicos	75
3.2.3.1. Obtenção do extrato proteico	75
3.2.3.2. Determinação do conteúdo total de proteínas nas amostras	75
3.2.3.3. Atividade da enzima β -1,3-glucanase	75
3.2.3.4. Atividade da enzima quitinase	76
3.2.3.5. Atividade da enzima guaiacol peroxidase (POX).....	76
3.2.3.6. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL).....	76
3.2.3.7. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO).....	77
3.2.3.8. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD)	77
3.2.3.9. Atividade da enzima catalase (CAT)	77
3.2.3.10. Determinação do conteúdo total de fenóis	77
3.2.3.11. Análises estatísticas	78
3.3. Resultados E Discussão	78
3.3.1. Avaliação da severidade da antracnose em mangas tratadas e inoculadas com o patógeno	78
3.3.2. Testes bioquímicos	83
3.3.2.1. Conteúdo total de proteínas e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase.....	83
3.3.2.2. Atividade da guaiacol-peroxidase (POX), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO).....	91
3.3.2.3. Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL).....	101
3.3.2.4. Conteúdo total de fenóis nas amostras.....	104
3.4. Conclusões	107
REFERÊNCIAS	108
 4. EFEITO DO EXTRATO DA ALGA MARINHA <i>Ascophyllum nodosum</i> E DO FOSFITO DE POTÁSSIO SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DE MANGAS ‘TOMMY ATKINS’ NA PÓS-COLHEITA	121
Resumo.....	121
Abstract	121
4.1. Introdução.....	122
4.2. Material E Métodos	124
4.2.1. Análises físicas	125
4.2.2. Análises químicas	125
4.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas	126
4.3. Resultados E Discussão	126
4.4. Conclusões	144
REFERÊNCIAS	145

RESUMO

Efeito do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio na morfofisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, na indução de resistência em mangas ‘Tommy Atkins’ contra a antracnose e em características físicas e químicas desses frutos

A mangicultura é uma das atividades mais importantes para a fruticultura brasileira. Dentre as variedades produzidas, o cultivar ‘Tommy Atkins’, sem dúvida, é o mais expressivo. Após a colheita, a qualidade fisiológica das mangas, geralmente, é mantida pela integração de técnicas de controle físico e aplicação de moléculas com atividade biológica contra microrganismos, a exemplo dos fungicidas aplicados no controle do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal da antracnose, principal doença na fase de pós-colheita de mangas. Entretanto, atualmente há forte pressão da população para a utilização de moléculas que deixem nenhum ou o mínimo possível de resíduos em alimentos, especialmente os consumidos *in natura*. Vários produtos são vendidos no Brasil como biofertilizantes, mas, estes apresentam também, a capacidade de mitigar estresses bióticos e abióticos, inerentes da vida pós-colheita de frutas. Nesse contexto, pode-se citar o extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Acadian®) e o fosfito de potássio (Phytogard®), utilizados em vários passos do processo de produção agrícola, mostrando respostas diversas sobre os vegetais tratados. Ambos os produtos apresentam baixa toxicidade ao homem e ao ambiente e não são fitotóxicos. Assim, com a ideia de gerar informação mais acertada acerca dos processos envolvidos a partir da utilização desses produtos, na cadeia produtiva da manga, este trabalho foi construído sobre três vertentes principais. A primeira parte, objetivou verificar o efeito *in vitro* do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a morfofisiologia do fungo *C. gloeosporioides* isolado de mangas, variedade ‘Tommy Atkins’. Na segunda parte, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio, ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre o parasitismo do fungo *C. gloeosporioides* em mangas ‘Tommy Atkins’, na perspectiva da indução de resistência, na fase de pós-colheita desses frutos. Finalmente, na terceira parte do trabalho, objetivou-se verificar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio, ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre características físicas e químicas de mangas ‘Tommy Atkins’, na fase de pós-colheita. Como resultados da primeira parte do trabalho, observou-se que o extrato de algas induz o crescimento e a esporulação do fungo, inibindo, contudo, a germinação e a fixação de conídios produzidos pelo patógeno. O fosfito de potássio interfere no crescimento e esporulação do microrganismo e inibe a germinação e adesão de conídios produzidos por *C. gloeosporioides*. Os dois produtos alteram a permeabilidade seletiva da membrana plasmática da hifa e incrementam a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase na estrutura. Entretanto, somente o extrato de algas interferiu no conteúdo total de proteínas da hifa, aumentando esse parâmetro. Os dois produtos diminuíram a atividade celulolítica de *C. gloeosporioides*. Na segunda parte, os resultados demonstraram que, tanto para o extrato de algas quanto para o fosfito de potássio, houve diminuição do tamanho da lesão, da velocidade de crescimento da lesão e da AACPD. Além disso, foram observados incrementos em todos os parâmetros bioquímicos analisados, o que indicou que os produtos têm efeito indutor de resistência em mangas. Finalmente, como resultados para a terceira parte do trabalho, foi evidenciado que tanto o extrato de algas quanto o sal de potássio, em todas as concentrações utilizadas, ajudaram na redução da perda de massa dos frutos, retardaram a diminuição do ângulo de cor da polpa (ângulo Hue) e a firmeza desta. Além disso, os produtos testados desaceleraram a perda de acidez da polpa e mantiveram elevados os valores de ácidos orgânicos, a exemplo do ácido cítrico; mantiveram abaixo do tratamento controle o conteúdo de sólidos solúveis (°Brix), mas não interferiram no total de carboidratos encontrados nas cascas dos frutos. Conclusivamente, o extrato de *A. nodosum* e o fosfito de potássio, retardam o amadurecimento e senescência de mangas na fase de pós-colheita, reduzem a severidade da antracnose nos frutos pela indução de resistência e ainda, apresentam efeitos diretos sobre o fungo *C. gloeosporioides*. Dessa maneira, os produtos podem ser utilizados como mantenedores da qualidade fisiológica de mangas ‘Tommy Atkins’, pois minimizam os estresses de ordem biótica e abiótica relativos à vida pós-colheita dessas frutas.

Palavras-chave: Controle alternativo; Proteínas-RP; Qualidade fisiológica; *Mangifera indica*; Celulases

ABSTRACT

Effect of *Ascophyllum nodosum* seaweed extract and potassium phosphite on the morphology of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, on the induction of resistance in 'Tommy Atkins' mango against anthracnose and on the physical and chemical characteristics of these fruits

Mango farming is one of the most important activities for Brazilian fruit growing. Among the varieties produced, the cultivar 'Tommy Atkins' is undoubtedly the most expressive. After harvesting, the physiological quality of mangoes is generally maintained by the integration of physical control techniques and the application of molecules with biological activity against microorganisms, such as the fungicides applied in the control of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, the causal agent of anthracnose, the main disease in the postharvest phase of mangoes. However, there is currently strong population pressure for the use of molecules that leave none or the least possible residues in food, especially those consumed *in natura*. Several products are sold in Brazil as biofertilizers, but also present the ability to mitigate biotic and abiotic stresses inherent of the postharvest fruit life. *Ascophyllum nodosum* seaweed extract (Acadian®) and potassium phosphite (Phytogard®), both used in several steps of the agricultural production process, can be mentioned in this context, showing different responses on treated plants. Both products have low toxicity to man and the environment and are not phytotoxic. Thus, in order to generate precise information about the processes involved in the use of these products, in the production chain of mango, this work was built on three main strands. The first part aimed to verify the *in vitro* effect of the *A. nodosum* seaweed extract and the potassium phosphite on the morphophysiology of the fungus *C. gloeosporioides* isolated from mangoes 'Tommy Atkins'. In the second part, the objective of this work was to evaluate the effect of *A. nodosum* seaweed extract and the potassium phosphite, both applied in different concentrations, on the parasitism of the fungus *C. gloeosporioides* in mangoes 'Tommy Atkins', from the perspective of induction of resistance in the postharvest phase of these fruits. Finally, in the third part of the work, the objective was to verify the effect of *A. nodosum* seaweed extract and of the potassium phosphite, both applied in different concentrations, on physical and chemical characteristics of 'Tommy Atkins' mangoes in the postharvest stage. As results of the first part of this work, it was observed that the algae extract induces the growth and sporulation of the fungus; however, it inhibits the germination and adhesion of conidia produced by the pathogen. Potassium phosphite interferes with the growth and sporulation of the microorganism and inhibits the germination and adhesion of conidia produced by *C. gloeosporioides*. The two products alter the selective permeability of hypha plasma membrane and increase the activity of the enzymes β -1,3-glucanase and chitinase in the structure. However, only the algae extract interfered in the total protein content of the hypha, increasing this parameter. The two products decreased the cellulolytic activity of *C. gloeosporioides*. In the second part, the results demonstrated that, for both algae extract and potassium phosphite, there was a decrease in lesion diameter, lesion growth rate and AUDPC. In addition, increments were observed in all biochemical parameters analyzed, which indicated that the products have resistance-inducing effect on mangoes. Finally, as results for the third part of the work, it was evidenced that both the algae extract and the potassium salt, in all the concentrations used, helped to reduce the loss of mass of the fruits, delayed the decrease of pulp color angle (Hue angle) and the firmness of this. In addition, the products tested decelerated the loss of acidity of the pulp and maintained high values of organic acids, as citric acid; controlled soluble solids content in relation to the control (°Brix), but did not interfere in the total carbohydrate found in the fruit peels. Conclusively, the *A. nodosum* extract and potassium phosphite, delay the maturation and senescence of mangoes in the post-harvest phase, reduce the severity of the anthracnose in the fruits by the induction of resistance and also have direct effects on the fungus *C. gloeosporioides*. In this way, the products can be used to maintain the physiological quality of 'Tommy Atkins' mangoes, since they minimize the biotic and abiotic stresses related to the postharvest life of these fruits.

Keywords: Alternative control; PR-proteins; Physiological quality; *Mangifera indica*; Cellulases

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1.** Estrutura de uma única cadeia de celulose, composta de milhares de unidades repetidas do dissacarídeo celobiose; uma unidade do dissacarídeo está representada no interior dos colchetes. As ligações do tipo β -1,4 também estão demonstradas na figura. Adaptada de Deacon (2005).....28
- Figura 2.2.** Estrutura e degradação enzimática da celulose. A enzima celobiohidrolase (CBH) cliva dissacarídeos de celobiose das extremidades não reduzidas das cadeias de celulose. A enzima endoglucanase (EG) cliva as cadeias de modo aleatório, gerando cadeias mais curtas, provendo também, sítios de ação para a CBH. A enzima β -glicosidase quebra a molécula de celobiose em dois resíduos de glicose que serão absorvidos pelo fungo. Adaptado de Deacon (2005).....29
- Figura 2.3.** *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de manga. **A.** Acérvulo do fungo com setas e hálides conidiogênicas com produção abundante de conídios; **B.** Conídios baciliformes característicos da espécie *C. gloeosporioides*. **C.** Confirmação da espécie *C. gloeosporioides* (MC1), isolada de manga, variedade 'Tommy Atkins', a partir da amplificação da região ITS do rDNA, por PCR, utilizando o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGCCTCCCGGGCGG-3'), específico da espécie, associado ao primer universal conservado ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGTATGC-3'), segundo metodologia de Afanador-Kafuri et al. (2003).....33
- Figura 2.4.** Representação esquemática do ensaio da interferência do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, 24 h após a incubação dos propágulos em diferentes concentrações dos produtos. **1.** Placa de Petri de acrílico, previamente marcada e com as suspensões de conídios; **2.** Campos marcados no fundo da placa. Os pontos nos quatro campos da extremidade representam os campos em que foram contados 50 conídios, totalizando 200 propágulos por parcela; **3.** Visualização dos campos por microscopia de luz, destacando **(A)** os conídios germinados, com tubo germinativo maior do que o comprimento do propágulo e **(B)** os conídios não germinados ou com tubo germinativo menor do que o comprimento do propágulo.....36
- Figura 2.5.** Representação esquemática do ensaio da interferência do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a aderência de conídios de *C. gloeosporioides*, 24 h após a incubação dos propágulos em diferentes concentrações dos produtos. **1.** Placa de Petri de acrílico, previamente marcada e com as suspensões de conídios; **2.** Campos marcados no fundo da placa. Os pontos marcados nos cinco campos representam a área de contagem dos conídios antes **(A)** e após **(B)** a lavagem das placas em água corrente.....37
- Figura 2.6.** Diâmetro médio das colônias do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após seis dias de incubação em meio de cultivo BDA, acrescido de diferentes concentrações (%) do extrato de *Ascophyllum nodosum* **(A)** e do fosfito de potássio **(B)**, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....41
- Figura 2.7.** Perfil do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (linha **A**) e do fosfito de potássio (linha **B**), após 7 dias de incubação. CN – Controle negativo; ASM – acibenzolar-S-metílico; E – Estrobilurina.....42
- Figura 2.8.** Micrografia eletrônica de varredura das hifas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* crescido nas concentrações de 1,0% do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* **(A)** e 0,4% do fosfito de potássio **(B)**, respectivamente, em relação ao controle negativo **(C)**, após 7 dias de cultivo. As barras, na parte superior da figura, representam 100 μ m do real.....43
- Figura 2.9.** Micrografia eletrônica de varredura de colônias do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* crescidas em meio de cultivo BDA, acrescido de 1,0% extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* **(A)** e de 0,4% do fosfito de potássio **(B)**, após 7 dias de cultivo. As setas sobre a parte 'B' da figura indicam os pontos de brotamento de novas hifas, pouco observados em 'A'. As barras na parte superior da figura representam 20 μ m do real.....43
- Figura 2.10.** Massa fresca, em gramas, do micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, após sete dias de cultivo em meio BD acrescido das diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* **(A)** e do fosfito de potássio **(B)**, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....44
- Figura 2.11.** Esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, expressa em número de conídios $\text{mL}^{-1} 10^6$, após sete dias de crescimento em concentrações (%) crescentes do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* **(A)** e do fosfito de potássio **(B)**, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....46

Figura 2.12. Porcentagem de germinação (A e B) e porcentagem de adesão (C e D) de conídios do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob a ação de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio. As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....47

Figura 2.13. Perda de eletrólitos, expressa em $\mu\text{S g}$ de micélio fresco⁻¹, pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após contato com diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B), por 10 min. O triton (Triton X-100), representa o controle positivo do teste.....48

Figura 2.14. Perda de eletrólitos, expressa em $\mu\text{S g}$ de micélio fresco⁻¹, do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, após 10 min de contato com diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B). O triton (Triton X-100), representa o controle positivo do teste. As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....49

Figura 2.15. Conteúdo total de proteínas (A), atividade da enzima β -1,3-glucanase (B) e atividade da enzima quitinase (C) do micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após sete dias de cultivo em meio BD acrescido de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....50

Figura 2.16. Conteúdo total de proteínas (A), atividade da enzima β -1,3-glucanase (B) e atividade da enzima quitinase (C) do micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após sete dias de cultivo em meio BD acrescido de diferentes concentrações (%) do fosfito de potássio, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....51

Figura 2.17. Capacidade celulolítica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob o efeito de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A, B e C) e do fosfito de potássio (D, E e F), além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). A e D: atividade da exo- β -1,4-glucanase; B e E: atividade da endo- β -1,4-glucanase; C e F: atividade da β -glicosidase.....53

Figura 2.18. Atividade celulolítica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado em meio MNM acrescido de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). (A) Atividade da exo- β -1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (B) atividade da endo- β -1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (C e D) atividade da β -glicosidase ao sexto e trigésimo dia de cultivo, respectivamente. As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....54

Figura 2.19. Atividade celulolítica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado em meio MNM acrescido de diferentes concentrações (%) do fosfito de potássio, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). (A) Atividade da exo- β -1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (B) atividade da endo- β -1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (C e D) atividade da β -glicosidase ao sexto e trigésimo dia de cultivo, respectivamente. As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio.....55

Figura 3.1. *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de manga. A. Acérvulo do fungo com setas e fiálides conidiogênicas com produção abundante de conídios; B. Conídios baciliformes característicos da espécie *C. gloeosporioides*. C. Confirmação da espécie *C. gloeosporioides* (MC1), isolada de manga, variedade 'Tommy Atkins', a partir da amplificação da região ITS do rDNA, por PCR, utilizando o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGCCTCCCGGGCGG-3'), específico da espécie, associado ao primer universal conservado ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGTATGC-3'), segundo metodologia de Afanador-Kafuri et al. (2003).....73

Figura 3.2. Avaliação da severidade da antracnose em frutos de manga, cultivar 'Tommy Atkins', tratados com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Diâmetro das lesões (mm), 12 dias após a inoculação do patógeno; (B) Velocidade de crescimento das lesões (mm dia^{-1}), calculada com base no diâmetro da lesão medido no 12º dia menos o diâmetro da lesão medido no 11º dia; (C) Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) das mangas tratadas. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato da alga marinha *A. Nodosum* utilizadas. ASM: Acibenzolar-S-metílico. Letras minúsculas dentro de um mesmo parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....79

Figura 3.3. Perfil das lesões geradas pelo parasitismo do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, 12 dias após a inoculação, em mangas do cultivar ‘Tommy Atkins’ tratadas com diferentes concentrações percentuais do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*. Controle: frutos tratados apenas com água (concentração zero); ASM: acibenzolar-S-metílico.....80

Figura 3.4. Avaliação da severidade da antracnose em frutos de manga, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratados com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Diâmetro das lesões (mm), 12 dias após a inoculação do patógeno; (B) Velocidade de crescimento das lesões (mm dia⁻¹), calculada com base no diâmetro da lesão medido no 12º dia menos o diâmetro da lesão medido no 11º dia; (C) Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nas mangas tratadas. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. ASM: Acibenzolar-S-metílico. Letras minúsculas dentro de um mesmo parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....81

Figura 3.5. Perfil das lesões geradas pelo parasitismo do fungo *C. gloeosporioides*, 12 dias após a inoculação, em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações percentuais do fosfito de potássio. Controle: frutos tratados apenas com água (concentração zero); ASM: acibenzolar-S-metílico.....82

Figura 3.6. Conteúdo total de proteínas (mg de proteína g⁻¹ de tecido fresco), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Conteúdo total de proteínas nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato da alga marinha *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....84

Figura 3.7. Conteúdo total de proteínas (mg de proteína g⁻¹ de tecido fresco), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Conteúdo total de proteínas nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....85

Figura 3.8. Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mangas (mg de glicose min⁻¹ mg de proteína⁻¹), cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima β -1,3-glucanase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....86

Figura 3.9. Atividade da enzima β -1,3-glucanase (mg de glicose min⁻¹ mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima β -1,3-glucanase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....87

Figura 3.10. Atividade da enzima quitinase (unidade de quitinase mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima quitinase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....88

Figura 3.11. Atividade da enzima quitinase (unidade de quitinase mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima quitinase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....89

Figura 3.12. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase (POX) ($\Delta_{\text{abs}470\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da POX nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....92

Figura 3.13. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase (POX) ($\Delta_{\text{abs}470\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima guaiacol-peroxidase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....93

Figura 3.14. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) (unidades de SOD mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da SOD nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....94

Figura 3.15. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) (unidades de SOD mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima SOD nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....95

Figura 3.16. Atividade da enzima catalase (CAT) (unidades de CAT mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da CAT nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....96

Figura 3.17. Atividade da enzima catalase (CAT) (unidades de CAT mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima CAT nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....97

Figura 3.18. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO) ($\Delta_{\text{abs}420\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da PFO nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....98

Figura 3.19. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO) ($\Delta_{\text{abs}420\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima PFO nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....99

Figura 3.20. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (mg de ácido *trans*-cinâmico min⁻¹ mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da FAL nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....102

Figura 3.21. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (mg de ácido *trans*-cinâmico min⁻¹ mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e posteriormente inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da enzima FAL nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....103

Figura 3.22. Conteúdo total de fenóis (mg de catecol g de tecido seco⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Conteúdo total de fenóis nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. Nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....105

Figura 3.23. Conteúdo total de fenóis (mg de catecol g de tecido seco⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Conteúdo total de fenóis nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....106

Figura 4.1. Perda de massa percentual, ao longo de 12 dias, de mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*.....127

Figura 4.2. Perda de massa percentual, ao longo de 12 dias, de mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio.....127

Figura 4.3. Valores médios para o ângulo de cor (Hue) de polpas de manga ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A) e armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o ângulo de cor. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....129

Figura 4.4. Valores médios para o ângulo de cor (Hue) de polpas de manga ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio (A) e armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o ângulo de cor. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....130

Figura 4.5. Valores médios da firmeza (N) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A) e armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com a firmeza. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....133

Figura 4.6. Valores médios da firmeza (N) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio (A) e armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com a firmeza. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....134

Figura 4.7. Valores médios de pH de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o extrato de *Ascophyllum nodosum* (A), armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* o pH. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....135

Figura 4.8. Valores médios de pH de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o fosfito de potássio (A), armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* o pH. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....136

Figura 4.9. Valores médios acidez titulável (g de ácido cítrico 100 g⁻¹), em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o extrato de *Ascophyllum nodosum*, armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* a acidez titulável. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....137

Figura 4.10. Valores médios acidez titulável (g de ácido cítrico 100 g⁻¹), em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o fosfito de potássio, armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* a acidez titulável. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....138

Figura 4.11. Valores médios da quantidade de sólidos solúveis (°Brix) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A), armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o °Brix. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....140

Figura 4.12. Valores médios da quantidade de sólidos solúveis (°Brix) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio (A), armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o °Brix. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média.....141

Figura 4.13. Valores médios do conteúdo de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e açúcares não-redutores (C) em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* e armazenadas a 25 °C por 12 dias. As barras sobre os pontos nos gráficos representam o erro padrão da média.....142

Figura 4.14. Valores médios do conteúdo de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e açúcares não-redutores (C) em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e armazenadas a 25 °C por 12 dias. As barras sobre os pontos nos gráficos representam o erro padrão da média.....143

1. INTRODUÇÃO GERAL

A fruticultura é um dos setores de maior destaque no agronegócio brasileiro, apresentando ampla variedade de espécies produzidas em todo o país, nas mais diversificadas condições de clima. O Brasil ocupa hoje a posição de terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, ficando atrás apenas da China e da Índia (Treichel et al., 2016). A manga aparece em destaque entre as culturas com alto volume de produção, predileção nacional e exportações, estando presente em todas as regiões brasileiras e sendo de elevada importância econômica, principalmente, para as regiões Nordeste e Sudeste do país (Araújo et al., 2017). Juntas, as duas regiões são responsáveis por 99% da produção nacional da fruta (IBGE, 2016).

Ainda, segundo dados apresentados pelo IBGE (2016), no ano de 2014 o Brasil alcançou uma produção de 1.132.449 toneladas de manga. Entretanto, pouco mais de 1% desse total produzido foi exportando, estando essa atividade relacionada ao abastecimento do próprio país. Essa é a realidade de todos os países produtores da fruta, como apontou a FAO (2016), destacando que apenas 2,79% do total de mangas produzidas no mundo foram exportadas.

O cultivo da manga no Brasil se caracteriza pelo uso de tecnologias de irrigação, indução floral e variedades melhoradas (Oliveira et al., 2010). A variedade ‘Tommy Atkins’ se insere nesse contexto e é cultivada em todas as regiões produtoras da fruta (Freires et al., 2011; Araújo et al., 2017). Esses frutos são médios e grandes (até 13 cm de comprimento e pesam de 400 a 600 g), com cor da casca predominantemente avermelhada, grossa e lisa, resistentes ao manuseio e ao transporte. O fruto apresenta polpa de textura firme, coloração amarelo-escura quando madura, de sabor agradável, °Brix de 17 e poucas fibras. Nas condições brasileiras, a produção natural de meia-estação do fruto se concentra nos meses de outubro a janeiro, mas, devido às técnicas de indução floral e a produção em pomares irrigados, há fruta disponível nos mercados do país durante todo o ano. O fruto apresenta ainda moderada resistência à antracnose, no entanto, na fase de pós-colheita, a doença geralmente se desenvolve com facilidade (Almeida, 2000; Filgueiras, 2000; Lopes et al., 2003; Mouco & Albuquerque, 2010; Araújo et al., 2017).

A vida pós-colheita da manga é limitada por diversos fatores, sendo, o mais recorrente, o desenvolvimento de patógenos. A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., é a doença mais importante nessa fase e gera perdas de até 30% nos frutos (Silva et al., 2002). O patógeno afeta todos os órgãos da mangueira, contudo, o prejuízo maior é nas mangas, onde aparecem manchas escuras e irregulares na casca, que podem coalescer envolvendo grandes áreas do fruto e que acabam por impedir a comercialização destes (Fischer et al., 2009). A infecção normalmente advém do campo e fica quiescente até que o fruto amadureça, estágio em que há diminuição das defesas naturais e aumento do conteúdo de carboidratos que servirão para a nutrição do patógeno. Nos estágios mais avançados da doença no fruto, é observado sobre a lesão, um crescimento alaranjado e mucilaginoso, proveniente na esporulação de *C. gloeosporioides* sobre o órgão (Prusky, 1996; Prusky et al., 2013).

O controle da doença no campo se concentra na pulverização das plantas com fungicidas, especialmente os cúpricos. Frutos destinados à exportação, passam por um tratamento pós-colheita que consiste na imersão destes em solução fungicida a 55 °C por 5 minutos (Terao et al., 2016). Entretanto, há crescente preocupação mundial com os níveis de resíduos químicos nos alimentos, especialmente, os consumidos *in natura* e também, com os níveis de contaminação dos agroecossistemas, gerada pelo uso indiscriminado dessas moléculas. Assim, diversos produtos com potencial na diminuição dos prejuízos causados pelos fitopatógenos, vêm sendo cada vez mais utilizados. No Brasil, no entanto, a maioria dessas moléculas com potencial de reduzir os danos causados por doenças na fase de pós-colheita e seguras tanto para a saúde do homem, dos animais e do ambiente, não são registradas para essa finalidade, havendo, com isso, escassez de informação acerca do potencial que tais compostos apresentam nas diversas fases do sistema de

produção (Pascholati et al., 2014). Esse é o caso do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* L. e do fosfito de potássio. O extrato é utilizado há alguns anos em estudos pelo seu reconhecido aumento da qualidade dos processos fisiológicos dos vegetais. O produto é fabricado por diversas empresas, dentre elas a Acadian Seaplants, responsável pela distribuição do extrato de *A. nodosum*, Acadian®, no Brasil. Seu efeito em plantas já foi evidenciado para diversas culturas, sendo destacada sua atividade direta sobre microrganismos fitopatogênicos, o seu potencial na indução de resistência de vegetais contra patógenos e na melhoria da qualidade fisiológica da planta tratada (Coșoveanu et al., 2010; Craigie, 2011; Jayaraman et al., 2011). O fosfito de potássio, distribuído no país pela Stoller do Brasil Ltda., com o nome comercial de Phytogard®, é recomendado como um fertilizante foliar, sendo um produto de baixo custo, não fitotóxico e de baixa toxicidade à mamíferos (Dalio et al., 2014). Na literatura, vários trabalhos confirmam o potencial do fosfito de potássio no controle de doenças e patógenos danosos a plantas (Amiri & Bompeix, 2011; Machinandiarena et al., 2012; Amaral et al., 2017), além dos efeitos da molécula sobre a maturação dos frutos (Grech, 2010) e qualidade fisiológica de vegetais diversos (Pelá et al., 2010; Bourscheidt, 2012; Vasquez et al., 2014).

Assim, com a ideia de gerar informação acerca dos processos envolvidos a partir da utilização desses produtos, na cadeia produtiva da manga, este trabalho foi construído sobre três vertentes principais. A primeira parte, objetivou verificar o efeito, *in vitro*, do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a morfofisiologia do fungo *C. gloeosporioides* isolado de mangas, variedade ‘Tommy Atkins’. Na segunda parte, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio, ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre o parasitismo do fungo *C. gloeosporioides* em mangas ‘Tommy Atkins’, na perspectiva da indução de resistência, na fase de pós-colheita desses frutos. Finalmente, na terceira parte do trabalho, objetivou-se verificar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio, ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre características físicas e químicas de mangas ‘Tommy Atkins’, na fase de pós-colheita.

Dessa maneira, pretende-se com este trabalho destacar e elucidar três pontos importantes do manejo da antracnose em mangas a partir da utilização do extrato da alga marinha e do sal de potássio, sendo: (1) a interação e efeito dos produtos sobre o agente causal da antracnose nessas frutas; (2) o potencial do extrato e do fosfito na indução de mecanismos de defesa nos frutos tratados e; (3) a possível interferência, positiva ou negativa, dos produtos na manutenção da qualidade fisiológica de mangas tratadas, pois, sendo a antracnose uma doença com infecção do tipo quiescente, produtos que alteram negativamente a qualidade fisiológica de frutos devem ser evitados, uma vez que, distúrbios fisiológicos, geralmente, culminam com o aumento da severidade de doenças. Diante do que foi dito, espera-se que este trabalho traga uma nova perspectiva acerca do manejo sustentável da antracnose em mangas, na fase de pós-colheita.

REFERÊNCIAS

- Almeida, C. D., Souza, J. D. S., Cordeiro, Z. J. M., Cordeiro, Z. (2000). **Aspectos socioeconômicos. Manga. Produção:** aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 11-14.
- Amiri, A., Bompeix, G. (2011). Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, 30(2), 222-227.
- Amaral, D. D., Monteiro, A. L. R., da Silva, E. I., de Oliveira Lins, S. R., de Oliveira, S. M. A. (2017). Frequência de fungos quiescentes e manejo alternativo da podridão peduncular em mamão na pós-colheita. **Revista Caatinga**, 30(3), 786-793.
- Araújo, D. O., Moraes, J. A. A., de Carvalho, J. L. M. (2017). Fatores determinantes na mudança do padrão de produção e consumo da manga no mercado nacional. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, 10 (Ed. esp.), 51-73.
- Bourscheidt, C. E. (2012). **Bioestimulante e seus efeitos agronômicos na cultura da soja (*Glycine max* L.)**. Monografia, Agronomia, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. 35 p.
- Coșoveanu, A. N. D. R. E. E. A., Axine, O., Iacomì, B. (2010). Antifungal activity of macroalgae extracts. **UASVM Bucharest**, 3, 442-447.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 371-393.
- Dalio, R. J., Fleischmann, F., Humez, M., Osswald, W. (2014). Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **PloS One**, 9(1), e87860.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2016). **Pesquisa Agrícola Municipal**. Disponível em <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 15 jun. 2017.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nation Statistics Division. **FAOSTAT**. 2016. Disponível em <http://faostat3.fao.org/browse/Q/*/E>. Acesso em: 10 de mai. 2017.
- Filgueiras, H. A. C. (2000). **Manga pós-colheita**. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia. 40p.
- Fischer, I. H., de Arruda, M. C., de Almeida, A. M., Galli, J. A., de Almeida Bertani, R. M., Marques-Jerônimo, E. (2009). Doenças pós-colheita em variedades de manga cultivadas em Pindorama, São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 31(2), 352-359.
- Freires, F. G. M., Granja, P. R. M., Carvalho, J. L. M. (2011). **Caracterização e análise da cadeia produtiva da manga orgânica na região do Vale do São Francisco**. XXXI Encontro Nacional de Engenharia de Produção, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Grech, N. M. (2010). **Methods for Delaying Maturity of Crops**. US Patent Applied. 12718, 881, 2010.
- Jayaraman, J., Norrie, J., Punja, Z. K. (2011). Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 353-361.
- Lopes, P. R. C., Oliveira, V. H., Freitas, J. A. D. (2003). **Produção integrada de frutas**. Fortaleza: Instituto Frutal. 160p.
- Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R., Andreu, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, 169(14), 1417-1424.

- Mouco, M. A. C., Albuquerque, J. A. S. (2010). Manejo da floração. In: Mouco, M. A. (Ed.). **O cultivo da mangueira**. Petrolina: Embrapa Semiárido. p. 11-45.
- Oliveira, A. R., Moreira, A. N., Teixeira, A. H. C., Paranhos, B. J., Santos, C. A. F. (2010). **Cultivo da Mangueira**. Disponível em <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/884451/1/CultivodaMangueira.pdf>>. Acesso em: 12 de mai. 2017.
- Pascholati, S. F., Melo, T. A., Brand, S. C., Rezende, D. C., Nogueira Júnior, A. F., Silva Júnior, M. B., Resende, M. L. V. (2014). Indução de resistência no controle de fitopatógenos: registro de indutores e uso comercial no Brasil. In: Schwan-Estrada, K. R. F., da Silva, C. M., Maia, A. J., Colella, J. C. T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA. p. 233-254.
- Pelá, A., Sales-Rodrigues, M., Silva Santana, J. D., Teixeira, I. R. (2009). Fontes de fósforo para adubação foliar na cultura do feijoeiro. **Scientia Agraria**, 10(4).
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, 34(1), 413-434.
- Prusky, D., Alkan, N., Mengiste, T., Fluhr, R. (2013). Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. **Annual Review of Phytopathology**, 51, 155-176.
- Silva, C. R. R., Fonseca, E. B. A. Moreira, M. A. (2002). **A cultura da mangueira**. Lavras: UFLA. 116p.
- Terao, D., Batista, D.C., Ribeiro, I. J. A. (2016). Doenças da Mangueira. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. vol. 2. São Paulo: Agrômica Ceres. p. 523-534.
- Treichel, M., Kist, B. B., Santos, C. E., Carvalho, C., Beling, R. R. (2016). **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2016**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul. 88 p.
- Vasquez, G. H., Lazarini, E., Camargo, F. P. D., Ferreira, R. B., Peres, A. R. (2014). Produtividade, qualidade fisiológica e composição química de sementes de crambe em diferentes doses de fósforo. **Bioscience Journal**, 707-714.

2. EFEITO MORFOFISIOLÓGICO DO EXTRATO DA ALGA MARINHA *Ascophyllum nodosum* E DO FOSFITO DE POTÁSSIO SOBRE O FUNGO *Colletotrichum gloeosporioides*

Resumo

Os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* estão entre os mais importantes fungos fitopatogênicos do mundo. Em se tratando das espécies frutíferas, inúmeras delas são infectadas pelo fungo e as perdas mais significativas são observadas quando a infecção acontece na fase de formação dos frutos. A antracnose, doença causada por fungos do gênero, ocorre praticamente em todos os tecidos da planta infectada, tanto nos tecidos em desenvolvimento quanto nos maduros e o controle da doença no campo é feito por meio de uma associação de métodos culturais e químicos. Entendendo a necessidade crescente por novas tecnologias de manejo de doenças de plantas, que atendam a demanda atual por uma produção sustentável, a utilização de produtos naturais na agricultura, dentre eles, os extratos à base de algas marinhas, e também de produtos de baixo risco ao ambiente e ao homem, a exemplo do fosfito de potássio, é cada vez mais expressiva. Contudo, o efeito desses produtos em todo o agroecossistema, especialmente no patógeno, deve ser entendido e bem estabelecido. Assim, este trabalho objetivou verificar o efeito *in vitro* do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Acadian®) e do fosfito de potássio (Phytogard®) sobre a morfofisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mangas da variedade 'Tommy Atkins'. O trabalho foi dividido em duas etapas. Na primeira, avaliou-se o efeito dos produtos sobre características morfológicas do microrganismo como o crescimento micelial, a massa fresca do micélio, a esporulação, a germinação e a fixação de conídios produzidos pelo patógeno. Na segunda, verificou-se o efeito dos produtos sobre a fisiologia da hifa, avaliando os parâmetros condutividade elétrica da membrana plasmática, o conteúdo total de proteínas no micélio, a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase e a interferência na capacidade celulolítica do fungo, medida pela atividade das enzimas endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase e β -glicosidase. Foram testadas 4 concentrações, de modo independente, para cada produto, sendo: 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0%, para o extrato de algas e 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%, para o fosfito de potássio. Nos dois casos foram utilizados três controles, sendo: 150 μ g de Amistar® (estrobilurina) L⁻¹, 50 mg de Bion® (acibenzolar-S-metílico – ASM) L⁻¹ e um controle sem nenhum tipo de produto (controle negativo). Os resultados demonstraram que o extrato de algas induz o crescimento e a esporulação do fungo, contudo, inibe a germinação e adesão de conídios produzidos pelo patógeno. O fosfito de potássio interfere no crescimento e esporulação do microrganismo e inibe a germinação e adesão de conídios produzidos por *C. gloeosporioides*. Os dois produtos alteram a permeabilidade seletiva da membrana plasmática da hifa e incrementam a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. Entretanto, somente o extrato de algas interferiu no conteúdo total de proteínas da hifa, aumentando esse parâmetro. Os dois produtos diminuíram a atividade celulolítica de *C. gloeosporioides*. Dessa forma, tanto o extrato de algas quanto o fosfito de potássio se configuram como alternativas promissoras ao manejo deste que é um dos fitopatógenos de maior importância econômica para o Brasil.

Palavras-chave: Antracnose; Controle alternativo; Produtos naturais

Abstract

The filamentous fungi of the genus *Colletotrichum* are among the most important phytopathogenic fungi in the world. Regarding the fruit species, countless of them are infected by the fungus and the most significant losses are observed when the infection happens in the fruit formation phase. Anthracnose, a disease caused by fungi of the genus, occurs in virtually all tissues of the infected plant, both in developing and mature tissues and control of disease in the field is carried out through an association of cultural and chemical methods. Understanding the growing need for new technologies for the management of plant diseases, which meet the current demand for sustainable production, the use of natural products in agriculture, among them seaweed extracts, as well as low risk products to the environment and human beings, like potassium phosphite, is more and more expressive. However, the effect of these products on the entire agroecosystem, especially on the pathogen, must be understood and well established. This work aimed to

verify the *in vitro* effect of *Ascophyllum nodosum* (Acadian®) seaweed extract and potassium phosphite (Phytogard®) on the morphology and physiology of the fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from mango of the 'Tommy Atkins' variety. The assays were divided into two steps. In the first one, the effect of the products on morphological characteristics of the microorganism was evaluated, such as mycelial growth, fresh mass of the mycelium, sporulation, germination and adhesion of conidia produced by the pathogen. In the second one, the effect of the products on the physiology of the hypha was verified. Then, were evaluated the parameters electrical conductivity of the plasma membrane, the total content of proteins in the mycelium, the activity of the enzymes β -1,3-glucanase and chitinase and the interference in the cellulolytic capacity of the fungus, measured by the activity of the enzymes endo- β -1,4-glucanase, exo- β -1,4-glucanase and β -glycosidase. Four concentrations were tested independently for each product: 0.1%, 0.3%, 0.5% and 1.0%, for the algae extract and 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4% for potassium phosphite. In both cases, three controls were used: 150 μ g Amistar® (strobilurin) L⁻¹, 50 mg Bion® (acibenzolar-S-methyl – ASM) L⁻¹ and one control without any type of product (negative control). The results demonstrated that the algae extract induces the growth and sporulation of the fungus; however, it inhibits the germination and adhesion of conidia produced by the pathogen. Potassium phosphite interferes with the growth and sporulation of the microorganism and, inhibits the germination and adhesion of conidia produced by *C. gloeosporioides*. Both products alter the selective permeability of the plasma membrane of the hypha and increase the activity of the enzymes β -1,3-glucanase and chitinase. However, only the algal extract interfered in the total protein content of the hypha, increasing this parameter. The two products decreased the cellulolytic activity of *C. gloeosporioides*. Thus, both the algae extract and the potassium phosphite are presented as promising alternatives to the management of the causal agent of anthracnose in several crops, one of the phytopathogens of greatest economic importance for Brazil.

Keywords: Anthracnose; Alternative control; Natural products.

2.1 Introdução

Os fungos filamentosos do gênero *Colletotrichum* Corda e a forma teleomórfica *Glomerella* Spauld & Scherenk, estão entre os mais importantes fungos fitopatogênicos do mundo. Esses microrganismos causam danos econômicos significativos em plantas e órgãos vegetais espalhados pelas regiões tropicais, subtropicais e também, temperadas do globo (Perfect et al., 1999). Cereais, hortaliças, plantas ornamentais, leguminosas e espécies frutíferas podem ser seriamente prejudicadas pelo patógeno (Bailey & Jeger, 1992). Em se tratando das espécies frutíferas, inúmeras delas são infectadas pelo fungo e as perdas mais significativas são observadas quando a infecção acontece na fase de formação dos frutos (Freeman et al., 1998). As espécies de *Colletotrichum* causam uma doença de sintomas típicos conhecida como antracnose, caracterizada, quando no fruto, pelo aparecimento de lesões necróticas e deprimidas no tecido do órgão, sobre a qual, uma massa mucilaginosa de conídios de coloração alaranjada é produzida (Bailey & Jeger, 1992). A antracnose ocorre praticamente em todos os tecidos da planta infectada, tanto nos tecidos em desenvolvimento, quanto nos maduros (Bernstein et al., 1995). Dois tipos distintos de antracnose podem ocorrer, o primeiro está relacionado com o aparecimento dos sintomas da doença nas plantas e frutos ainda no campo, enquanto que o segundo ocorre nos frutos maduros, após a colheita. A habilidade do patógeno de causar infecções quiescentes colocou o *Colletotrichum* no grupo de patógenos de maior importância econômica para as frutas na fase de pós-colheita (Freeman et al., 1998).

Existem inúmeros casos na literatura com relatos da ocorrência de espécies distintas de *Colletotrichum* causando doença em uma única planta hospedeira. Por exemplo, a antracnose em mangas e abacates pode ser causada tanto pela espécie *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. quanto pela espécie *C. acutatum* Simmonds (Hartill, 1992; Prusky, 1996; Phoulivong et al., 2010). Ainda em mangas, a literatura registra a suscetibilidade desses frutos a mais cinco espécies, sendo elas a espécie *C. fructicola* (Prihast, Cai & Hyde), a *C. asianum* (Prihast, Cai & Hyde), a *C. dianesei* (Lima, Câmara & Michereff) a *C. karsti* (Yang, Liu, Hyde & Cai) e a espécie *C. tropicale* (Rojas, Rehner & Samuels) (Lima et al., 2015). Morangos, podem ser infectados por três espécies distintas do fungo, sendo elas *C. fragariae* Brooks, *C. acutatum* e *C. gloeosporioides*. Nesse caso, as três espécies podem causar doença tanto nos frutos quanto em outras partes da planta. Amêndoas e outros frutos decíduos podem apresentar sintomas de antracnose gerados tanto pela espécie *C. acutatum* quanto pela espécie *C. gloeosporioides* (Adaskaveg & Hartin, 1997; Bernstein et al., 1995; Shabi & Katan, 1983; Shih et al., 2000). Plantas de *Citrus* podem ser acometidas por quatro tipos distintos de antracnose: a prodrisão floral do citros e a antracnose do citros, ambas causadas pela espécie *C. acutatum* e, a morte dos ramos e as manchas foliares, doenças causadas pela espécie *C. gloeosporioides* (Zulfiqar et al., 1996). Adicionalmente, outros exemplos de hospedeiros que são afetados por múltiplas espécies do fungo incluem o cafeeiro, as curcubitáceas, as pimenteiras e o tomateiro (Duarte et al., 2005; Kurozawa et al., 2005; Kurozawa & Pavan, 2005; Zambolim et al., 2005).

É comum também encontrarmos no ambiente uma única espécie de *Colletotrichum* infectando mais de um hospedeiro. A espécie *C. gloeosporioides* e o seu teleomorfo *Glomerella cingulata*, a qual é considerada uma espécie cumulativa (vários hospedeiros), e que forma a fase sexual sob certas condições, é capaz de infectar inúmeras frutas, como, por exemplo, mangas, abacates, morangos, maçãs, amêndoas, dentre outras (Binyamini & Schiffmann-Nadel, 1972; Fitzell, 1987; Shabi & Katan, 1983). *G. cingulata* é um Ascomiceto pertencente à ordem Melanconiales, Família Melanconiaceae. Seu anamorfo, *C. gloeosporioides*, produz acérvulos subepidérmicos, dispostos em círculos. Os conídios são liberados dos acérvulos através de uma massa viscosa de coloração rosada. Esses conídios são hialinos e baciliformes de ápices arredondados, uninucleados, com 12-19 µm de comprimento por 1,0-6,0 µm de largura, sendo levemente curvos. Os peritécios são rostrados, subesféricos e agrupados em um estroma ou bem separados, sendo que esse estroma pode estar bem desenvolvido ou ser ausente. Ascósporos são subclavados, medindo 42-60 x 10-12 µm. Ascósporos são hialinos, unicelulares, curvados e medem 12-24 x 4-6 µm (Terao et al., 2016).

Os conídios produzidos por *C. gloeosporioides* são disseminados na natureza principalmente carregados pela água da chuva, e têm desenvolvimento ótimo sob condições de umidade relativa alta, acima de 95%, e temperatura na faixa dos 25 °C. Ao alcançar a superfície do hospedeiro, o conídio se expande em direção a uma das extremidades para a formação do tubo germinativo que, tão logo se desenvolva, forma em seu ápice, uma estrutura arredondada e melanizada, o apressório. Este último, fixa-se na superfície do vegetal e, auxiliado por enzimas líticas, degrada a superfície intacta do fruto e alcança o seu interior. Assim, de maneira coordenada e em uma sequência lógica, os conídios do fungo devem ser capazes de se aderir à superfície do hospedeiro, germinar, produzir estruturas de penetração ou, quando possível, germinar e entrar por ferimentos na superfície do órgão vegetal. Finalmente, o patógeno deve ser capaz de ativar fatores de patogenicidade para o desenvolvimento da doença (Prusky, 1996). Para ser bem-sucedido nesse processo, o fungo deve se sobrepor às defesas impostas pelo hospedeiro e ser capaz de se desenvolver sob condições fisiológicas e ambientais prevalentes no momento da infecção.

A adesão de conídios às plantas hospedeiras é essencial para o início da doença. No gênero *Colletotrichum*, conídios são produzidos e dispersados pela água da chuva e rapidamente se fixam às partes aéreas das plantas hospedeiras (Nicholson, 1992; Anderson & Nicholson, 1996; Mercure et al., 1994a). Os conídios são produzidos em

acérvulos embebidos em uma matriz mucilaginosa, composta por glicoproteínas de alta massa molecular, sendo, algumas dessas moléculas, ricas em prolina (Nicholson, 1992). Essa mucilagem contém inibidores de germinação, assim como uma variedade de enzimas. Funciona como uma matriz protetora dos conídios contra a dessecação e metabólitos tóxicos produzidos pela planta (Mercure et al., 1994b). Além disso, como relatado para a espécie *C. graminicola* (Ces.) Wilson, a mucilagem que envolve o acérvulo tem papel importante também na adesão do conídio no hospedeiro (Mercure et al., 1994a).

A capacidade inicial de adesão dos conídios de *Colletotrichum* à cutícula do vegetal envolve interações hidrofóbicas, assim como ocorre para muitos fungos fitopatogênicos (Nicholson & Epstein, 1991; Mercure et al., 1994a). A adesão de conídios das espécies *C. musae* (Berk. & Curtis) e *C. graminicola*, por exemplo, aparentemente requer também um metabolismo ativo, que inclui a síntese de uma série de proteínas (Young & Kaus, 1984; Sela-Buurlage et al., 1991; Mercure et al., 1994b). É sugerido que esse processo esteja relacionado com a segunda fase da adesão, a qual pode servir para a consolidação da interação hidrofóbica inicial. Em algumas espécies de *Colletotrichum*, essa segunda fase de adesão está relacionada com exudatos proteicos, os quais são liberados a partir do conídio, como uma fina camada sobre o substrato, como ocorre para a espécie *C. gloeosporioides* (Mercure et al., 1994b). Entretanto, para algumas espécies, a exemplo do *C. lindemuthianum*, não há liberação de nenhum tipo de exudato proteico (O'Connell et al., 1996).

A adesão do tubo germinativo e do apressório à superfície do hospedeiro é, geralmente, mais intensa do que a adesão do conídio (Perfect et al., 1999). A ligação do apressório ao substrato é, particularmente, mais forte para garantir uma base firme à penetração da hifa infectiva. Tal fato já foi comprovado a partir de análises em que se observou fragmentos da parede celular do apressório aderida à superfície do substrato, mesmo depois da retirada da estrutura por sonificação (Pain et al., 1996). Fibrilas de comprimento médio de 6 µm são formações normalmente encontradas na superfície de tubos germinativos e apressórios de espécies do gênero *Colletotrichum*. Acredita-se que essas estruturas, presentes na matriz extracelular, sejam responsáveis pela adesão do patógeno nessa fase. Glicoproteínas com propriedades adesivas já foram identificadas e descritas para as espécies *C. lindemuthianum* e *C. graminicola*, sendo estas secretadas tanto pelo tubo germinativo quanto pelo apressório e detectadas sobre o substrato mesmo após a retiradas dessas estruturas por sonificação (Pain et al., 1996; O'Connell et al., 1996).

Os conídios de *Colletotrichum* percebem tanto estímulos físicos quanto químicos a partir da superfície do hospedeiro e assim, ativam a germinação desses propágulos. Dando seguimento à germinação da estrutura, o tubo germinativo se diferencia para a formação do apressório. Exemplo de estimulantes químicos presentes no vegetal podem ser encontrados nos trabalhos realizados com *C. gloeosporioides* em abacate e *C. musae* em banana (Podila et al., 1993; Kolattukudy et al., 1995). A germinação dos conídios da espécie *C. gloeosporioides* e subsequente formação dos apressórios, é seletivamente ativada pela superfície cerosa que recobre os frutos. A sinalização é específica, uma vez que ceras produzidas pelos diferentes vegetais apresentam estrutura molecular variável entre si, assim, as espécies fúngicas são estimuladas por moléculas com estruturas distintas entre si (Podila et al., 1993; Kolattukudy et al., 1995; Perfect et al., 1999). Além disso, o etileno, hormônio vegetal responsável pelo amadurecimento do fruto, também está relacionado com a indução da germinação do conídio e formação do apressório nas duas espécies, *C. gloeosporioides* e *C. musae*, patógenos que têm preferência por frutos climatéricos. O hormônio não influencia espécies do gênero que parasitam frutos não climatéricos (Kolattukudy et al., 1995). Assim, esporos que alcançam a superfície dos frutos em desenvolvimento, germinam e penetram o substrato induzidos pela sinalização gerada pela cera que recobre o órgão. Entretanto, o fungo permanece em estado de latência ou quiescência, até que o fruto amadureça e ocorra o estabelecimento das relações parasitárias estáveis (Kolattukudy et al., 1995). Para a espécie *C. gloeosporioides* tal fato já

foi bem estabelecido uma vez que, como demonstrado por Liu & Kolattukudy (1998), a formação do apressório só acontece quando, no momento da interação patógeno-hospedeiro, há presença de cera e do hormônio etileno.

Nas espécies de *Colletotrichum*, o tubo germinativo se diferencia em apressório na superfície do hospedeiro quando o crescimento apical da estrutura cessa e a ponta se achata, tornando-se delimitada por um septo (Deacon, 2005). A maturação do apressório envolve a formação de um poro de evaginação na base da célula, a deposição de novas camadas na parede celular e a secreção de substâncias na matriz extracelular. Em sequência, pigmentos como a melanina se depositam recobrendo toda a parede celular do apressório, próximos à membrana plasmática (Bailey & Jager, 1992). Ao redor do poro, um espesso anel se forma e, a partir dessa região, o crescimento da estrutura continua com a formação do *peg* de penetração e a perfuração da cutícula do vegetal, em um processo que envolve força mecânica, produzida por uma alta pressão de turgor, e degradação enzimática (Mendgen et al., 1996; Chen et al., 2004). Dessa maneira, fica claro que o apressório maduro é uma célula assimétrica e polarizada, com uma região superior ovalada e uma região basal achatada, sendo essa última preparada para a formação da hifa infectiva (Pain et al., 1996; Perfect et al., 1999).

Da germinação do conídio à formação das hifas que colonizarão o tecido hospedeiro, o crescimento de *Colletotrichum* spp., assim como nos demais fungos, é mais ativo na região apical dessas estruturas. Com exceção dos oomicetos, nenhum outro grupo de organismos cresce continuamente como um tubo que se alonga na extremidade pela síntese localizada de componentes estruturais da parede celular e, além disso, mostra tamanha plasticidade (Deacon, 2005). O citoesqueleto da hifa fúngica é formado basicamente por polímeros de quitina e glucanas em ligação β -1,3 (Alexopoulos et al., 1996). A quitina, é um polímero formado por unidades de β -1,4-N-acetilglicosamina e o seu metabolismo se divide em dois processos: síntese e degradação. A quitina-sintase, enzima produzida ao longo desse processo, catalisa a síntese de cadeias de quitina e é uma das principais moléculas responsáveis pela formação da parede celular fúngica. Assim, a enzima é produzida *in situ*, no ápice da hifa e pode ser translocada para outras partes da estrutura no interior de vesículas. Nesse momento, a quitina-sintase apresenta-se na forma do seu zimogênio, ou seja, inativada, sendo necessário, ao ser inserida na membrana plasmática, ser ativada por uma protease, que, provavelmente, também é produzida no ápice da hifa e chega até a enzima também no interior de vesículas. Estando a enzima ativada, o substrato para a produção do polímero, a N-acetilglicosamina, é direcionado para a porção interna da enzima, ancorada na membrana, e então, cadeias de quitina são formadas e liberadas a partir da parte externa da dupla camada fosfolipídica (Gow et al., 2002).

A glucana-sintase é outra enzima que também é importante no processo de construção da parede celular do fungo (Deacon, 2005). É responsável por catalisar a síntese das cadeias de β -1,3-glucana, molécula que, geralmente, constitui a maior parte da estrutura esquelética da hifa. Assim como acontece com a quitina-sintase, a glucana-sintase é produzida e chega à membrana da hifa, na porção apical, no interior de vesículas e prontamente é inserida nessa região (Mendgen & Hahn, 2002). O substrato utilizado por essa enzima para a produção das cadeias de β -1,3-glucana é a uridina difosfato-glicose, presente no citosol da hifa. A atividade da glucana-sintase é regulada de modo diferente ao que se observa na quitina-sintase (Howard, 2001; Mendgen & Hahn, 2002). A enzima é composta por duas subunidades, uma delas, presente na parte externa da membrana plasmática, contém o sítio catalítico da molécula e a outra subunidade, é formada por uma ligação proteica guanosina-trifosfato. Assim, a enzima é ativada quando a guanosina-trifosfato chega à porção citoplasmática sendo, a partir desse momento, cadeias de glucana sintetizadas e depositadas na parede da hifa. Essas cadeias parecem sofrer alterações adicionais ao serem depositadas na estrutura, especificamente, no número de ligações β -1,3 (Gow et al., 2002).

Sendo a hifa fúngica uma estrutura constantemente rígida em função da sua constituição (Bartnicki-Garcia, 1970), o fungo deve ser capaz de produzir enzimas que degradem os componentes estruturais da parede celular para, assim, crescer. Dessa forma, quitinases e β -1,3-glucanases são as enzimas responsáveis pelo catabolismo da parede celular que, menos rígida, tem a capacidade de alongação. Assim, o crescimento do fungo se dá pelo balanço existente entre a síntese e a degradação do citoesqueleto da hifa (Adams, 2004; Bauermeister et al., 2010).

No hospedeiro, a colonização é um processo dependente da capacidade do fungo em degradar as barreiras impostas pelo vegetal. Após atravessar a cutícula que recobre os frutos de um modo geral, o fungo *Colletotrichum* sp. deve ser capaz de transpor toda a estrutura celular do vegetal e esse avanço também é mediado por enzimas. Assim, para que o patógeno alcance o interior celular, ele deve ser capaz de produzir celulases, hemicelulases e ligninases, enzimas responsáveis pela degradação da celulose, hemicelulose e lignina, respectivamente (Gardner et al., 1987). Patógenos com essa capacidade, geralmente, apresentam alto grau de patogenicidade (Pascholati, 2011). Somado a isso, a degradação da lamela média, resultado da ação de enzimas pectinolíticas, gera a maceração dos tecidos do hospedeiro e os sintomas de podridão geralmente atrelados ao parasitismo de espécies do fungo *Colletotrichum* (Prusky, 1996; Tucker & Talbot, 2001; Chen et al., 2004). Sem dúvida, a capacidade celulolítica de um fungo auxilia sobremaneira os processos infectivos.

A celulose é o polímero natural mais abundante na terra, representando cerca de 40% de toda a biomassa vegetal que é produzida e reciclada em um ano (Deacon, 2005). Os fungos desempenham um papel fundamental na degradação desse polímero e também, na utilização dos produtos advindos dessa degradação (Taylor & Marsh, 1963; Walton, 1994).

Em termos de estrutura química, a celulose é um polímero relativamente simples. A molécula consiste de uma cadeia longa e não ramificada, composta por 2000 a 14000 resíduos de glicose, unidos entre si por ligações do tipo β -1,4. A configuração β da estrutura significa que cada unidade de glicose sofre um giro de 180° em relação à unidade seguinte, e a cadeia inteira é formada por essa repetição de pares (Figura 2.1).

Figura 2.1. Estrutura de uma única cadeia de celulose, composta de milhares de unidades repetidas do dissacarídeo celobiose; uma unidade do dissacarídeo está representada no interior dos colchetes. As ligações do tipo β -1,4 também estão demonstradas na figura. Adaptada de Deacon (2005)

A celulose pode ser facilmente degradada por enzimas extracelulares produzidas por fungos fitopatogênicos. Entretanto, a estrutura física da cadeia de celulose e a forma como ela se organiza na natureza dificulta o acesso das enzimas fúngicas que degradam o polímero. De modo individual, as cadeias de celulose ficam muito próximas umas às outras dando origem a micelas, as quais são reforçadas por meio da formação de pontes de hidrogênio. Assim, essas micelas se alinham formando microfibrilas de, aproximadamente, 10 nm de diâmetro, visíveis apenas por meio de microscopia eletrônica (Taiz & Zeiger, 2012). Essa estrutura rígida e insolúvel representa um importante obstáculo à decomposição enzimática, entretanto, muitos fungos desenvolveram meios de degradá-la.

Pelo menos três tipos de enzimas estão envolvidos na completa degradação da cadeia de celulose até a liberação de seus constituintes mais simples, as unidades de glicose (Garajova et al., 2016; Kracher et al., 2016). Conjuntamente, essas moléculas são chamadas de celulasas ou enzimas do complexo celulase, sendo elas: (i) uma **endoglucanase** ou **endo- β -1,4-glucanase**, a qual age em pontos aleatórios dentro da cadeia de celulose, quebrando a molécula em fragmentos menores. Trata-se de uma enzima que já foi encontrada em formas múltiplas, apresentando massa molecular que varia de 11000 a 65000 Da; (ii) uma **celobiohidrolase** ou **exo- β -1,4-glucanase**, uma enzima que age apenas na porção final da cadeia de celulose, clivando-a, sucessivamente, em unidades de dissacarídeos (celobiose). Essa enzima é mais uniforme que a endoglucanase, apresentando massa molecular que varia dos 50000 aos 60000 Da; (iii) uma **β -glicosidase** ou **celobiase**, que quebra a celobiose em moléculas de glicose, sendo, essas últimas, absorvidas pelo fungo (Ljungdahl & Eriksson, 1985; Beguin, 1990; Teeri, 1997). A ação dessas três enzimas está representada na Figura 2.2. Todas elas agem de modo sinérgico, porém, são reguladas por ativadores bioquímicos que garantem que açúcares não sejam liberados em uma taxa alta a ponto de serem desperdiçados pelo fungo. Assim, as endoglucanases atacam as cadeias de celulose de modo aleatório criando mais sítios de ação para a celobiohidrolase. A celobiose, resultante da ação coordenada dessas duas enzimas, pode se ligar ao sítio ativo da celobiohidrolase e, de modo competitivo, inibir a atividade da enzima. Logo, à medida que há acúmulo de celobiose, a degradação da celulose automaticamente diminui. Por fim, a liberação de moléculas de glicose funciona como repressor catabólico da atividade da celobiase e, dessa maneira, a degradação dos dissacarídeos formados também diminui (Deacon, 2005).

Figura 2.2. Estrutura e degradação enzimática da celulose. A enzima celobiohidrolase (CBH) cliva dissacarídeos de celobiose das extremidades não reduzidas das cadeias de celulose. A enzima endoglucanase (EG) cliva as cadeias de modo aleatório, gerando cadeias mais curtas, provendo também, sítios de ação para a CBH. A enzima β -glicosidase quebra a molécula de celobiose em dois resíduos de glicose que serão absorvidos pelo fungo. Adaptado de Deacon (2005)

No campo, o controle do fungo *Colletotrichum* sp. é feito por meio de uma associação de métodos culturais e químicos. Nessas condições, a utilização de maiores espaçamentos que favoreçam a ventilação e a insolação das plantas, o uso de podas leves que abram a copa das árvores para a penetração de raios solares, o emprego de podas de

limpeza que reduzem as fontes de inóculo e a instalação dos pomares em regiões mais secas, são medidas de manejo cultural que auxiliam no controle da antracnose (Terao et al., 2016). Arelado a essas medidas, o controle químico garante o sucesso na colheita. Até o aparecimento dos fungicidas orgânicos, os cúpricos eram utilizados com exclusividade e apresentavam diferenciados graus de sucesso (Terao et al., 2016). Dentre os produtos mais utilizados estão a calda bordalesa, o óxido cuproso, o oxicleto de cobre e o sulfato básico de cobre, sendo estes, ainda hoje, bastante eficientes especialmente quando aplicados na fase de pós-florescimento (Coelho et al., 2010; Raduan, 2017). Frutos destinados à exportação, passam por um tratamento pós-colheita que consiste na imersão desses frutos em solução fungicida a 55 °C por 5 minutos.

Além dos tradicionais fungicidas cúpricos, rotineiramente utilizados no manejo da antracnose, a azoxistrobina, fungicida pertencente a classe dos inibidores da quinona-oxidase, tem sido amplamente empregada para essa finalidade (Lima et al., 2015; Colman & Quintana, 2016). A azoxistrobina pertence ao grupo químico das estrobilurinas, juntamente com outras moléculas, como a piraclostrobina, a trifloxistrobina e o cresoxim-metílico. Possui como modo de ação a inibição da respiração dos fungos, especificamente por ligar-se ao sítio da quinona oxidase do citocromo b (complexo III) e inibindo o transporte de elétrons na mitocôndria (Fernández-Ortuño et al., 2010; Leadbeater, 2012). A germinação de propágulos infectivos do fungo é a etapa de maior sensibilidade às estrobilurinas (Oliver & Hewitt, 2014), sendo estas, portanto, moléculas que interferem em todos os processos posteriores à germinação do conídio.

Além do controle químico tradicional, diversos produtos naturais de origem biológica já foram testados e apresentam resultados promissores na interferência do metabolismo de espécies do fungo *Colletotrichum* (Abd-Alla & Haggag, 2010; Zheng et al., 2013; Leal et al., 2017). Dentre estes, os extratos produzidos a partir de algas marinhas, a exemplo da espécie *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol., são cada vez mais empregados para essa finalidade (Subramanian et al., 2011; Vera et al., 2011; Ribeiro et al., 2016).

Produtos à base da alga são vendidos no Brasil como fertilizantes de plantas. No grupo das algas marrons (Phaeophytas), a espécie *A. nodosum* se destaca, sendo encontrada no Oceano Atlântico, especificamente na região do Canadá, nos mares Árticos e no norte da Europa (Ugarte et al., 2006). Essa alga é utilizada há alguns anos em estudos pelo reconhecido aumento da qualidade dos processos fisiológicos dos vegetais, através da complementação de hormônios de crescimento (auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico), aminoácidos (alanina, ácido aspártico e glutâmico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, prolina, tirosina, triptofano e valina), nutrientes importantes (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn, Cu e Zn), indução de resistência, promoção da melhoria da qualidade dos frutos e crescimentos das plantas (Norrie & Keathley, 2005). Seu efeito em plantas já foi comprovado pelo tratamento de pepineiros com duas doses do produto (0,5 e 1%) e redução de doenças causadas, isoladamente, pelos fungos *Alternaria cucumerina* Dingley, *Didymella applanata* (Niessl) Sacc., *Fusarium oxysporum* Sm. & Swingle e *Botrytis cinerea* Pers. (Jayaraman et al., 2011). Extratos de outras algas marinhas, como *Alaria esculenta* (L.) Graville, *Fucus vesiculosus* (L.), *Spirulina platensis* e *Ecklonia máxima* (Osberck) Papenfuss, já foram testados *in vitro* e apresentaram expressivo efeito fungicida contra uma série de patógenos, incluindo as espécies *Fusarium roseum* Link e *F. oxysporum*, contudo, em doses muito altas, 50 e 90%, impossíveis de serem praticadas em cultivos comerciais (Coşoveanu et al., 2010).

Outro produto que vem apresentando resultados promissores no controle de fitopatógenos, é o fosfito de potássio. Esse produto é um composto proveniente do ácido fosforoso (H_3PO_3), sendo originado através de uma reação de neutralização com uma base, como o hidróxido de potássio, a qual é o mais frequentemente utilizada para este fim (Roma, 2013). Após a reação completa dessas moléculas, é formado o fosfito de potássio (McDonald et al., 2001).

Estudos realizados por McDonald et al. (2001) evidenciaram a atividade do fosfito de potássio como um fungicida eficiente no controle de Oomicetos como *Phytophthora*, *Plasmopara* e *Phytium*. Após esses eventos, foi lançado no mercado o produto Aliete®, cujo princípio ativo é o fosetyl-alumínio que, após a hidrólise do etil-fosfanato presente na molécula, libera o fosfito que agirá na proteção da planta e ainda, tem a capacidade de se translocar via floema e xilema. No Brasil, o fosfito de potássio é recomendado como um fertilizante foliar, sendo um produto de baixo custo, não fitotóxico e de baixa toxicidade à mamíferos (Dalio et al., 2014).

Em pós-colheita, há relatos da utilização do fosfito de potássio no controle de podridões em diversos frutos como pêssegos, no controle da podridão parda (Moreira et al., 2002), em manga, no controle da antracnose (Lins et al., 2011), em maçãs no controle do mofo azul (Blum et al., 2007; Amiri & Bompeix, 2011), e em uvas de mesa, no controle de podridões causadas por *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.) Vuill (Roma, 2013).

Entendendo a necessidade crescente por novas tecnologias de manejo de doenças de plantas, que atendam a demanda atual por uma produção sustentável, a utilização de produtos naturais na agricultura, dentre eles, os extratos à base de algas marinhas, e também de produtos de baixo risco ao ambiente e ao homem, a exemplo do fosfito de potássio, é cada vez mais expressiva. Contudo, o efeito desses produtos em todo o agroecossistema, especialmente no patógeno, deve ser entendido e bem estabelecido. Assim, este trabalho objetivou verificar o efeito *in vitro* do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Acadian®) e do fosfito de potássio (Phytogard®) sobre a morfofisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de mangas, variedade ‘Tommy Atkins’.

2.2. Material E Métodos

Os testes descritos a seguir foram realizados no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ – USP. Após o isolamento e identificação do isolado de *C. gloeosporioides* que foi utilizado nos ensaios, os experimentos foram divididos em duas etapas, sendo estas: (1) avaliação do efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a morfologia do fungo *C. gloeosporioides* e (2) fisiologia da hifa de *C. gloeosporioides* sob a ação do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio, com base na atividade elétrica da membrana plasmática da hifa, conteúdo de proteínas e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase e atividade interferência na atividade celulolítica do fungo.

2.2.1. Obtenção do isolado

Frutos de manga, variedade ‘Tommy Atkins’, apresentando lesões típicas de antracnose, foram levados ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica – ESALQ/USP, lavados com água corrente e postos em condições de câmara úmida para acelerar o progresso da doença e o aparecimento de sinais do patógeno. Decorridos 4-5 dias, os frutos começaram a apresentar lesões enegrecidas, deprimidas na parte central e, sobre algumas dessas, ocorreu o aparecimento de uma massa mucilaginosa de coloração alaranjada, característica do processo de esporulação do fungo sobre o fruto. A partir dessa massa de esporos, foi feito o isolamento direto do patógeno para o meio de cultivo BDA (batata-dextrose-água), sendo em seguida, incubado em câmara tipo BOD a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12 h, por 7 dias. Após esse período, o fungo foi novamente inoculado em uma manga sadia e reisolado, fechando-se assim o Postulado de Koch. A partir do reisolamento, foi obtida cultura pura do patógeno e, em um primeiro momento, a espécie foi confirmada por características morfológicas da colônia e do conídio, com auxílio de microscopia de luz e técnicas de microcultura (Figura 2.3A e 2.3B). Posteriormente, com o apoio do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (Campus São Luís, MA), o isolado foi confirmado como sendo a espécie *C. gloeosporioides* por meio da técnica de PCR espécie-específica, mediante a análise da região ITS do rDNA do fungo, segundo protocolo proposto por Afanador-Kafuri et al. (2003) (Figura 2.3C).

Figura 2.3. *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de manga. **A.** Acérvulo do fungo com setas e fiáldes conidiogênicas com produção abundante de conídios; **B.** Conídios baciliformes característicos da espécie *C. gloeosporioides*. **C.** Confirmação da espécie *C. gloeosporioides* (MC1), isolada de manga, variedade 'Tommy Atkins', a partir da amplificação da região ITS do rDNA, por PCR, utilizando o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGCCTCCCGGGCGG-3'), específico da espécie, associado ao primer universal conservado ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGTATGC-3'), segundo metodologia de Afanador-Kafuri et al. (2003)

2.2.2. Avaliação do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a morfologia do fungo *C. gloeosporioides*

2.2.2.1. Crescimento micelial

A partir da obtenção de placas de Petri contendo colônias puras de *C. gloeosporioides*, os testes de crescimento micelial do fungo foram executados. Para isso, diferentes concentrações para os respectivos produtos testados foram utilizadas, sendo 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0%, para o extrato de *A. nodosum* (Acadian®) e 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%, para o fosfito de potássio (Phytogard®). As concentrações foram preparadas por incorporação dos produtos de forma individualizada em meio BDA fundente. Foram utilizados três controles diferentes. O primeiro foi o controle positivo 1, composto por 150 µg de Amistar® (estrobilurina) L de meio BDA⁻¹, o segundo foi o controle positivo 2, composto por 50 mg de Bion® (acibenzolar-S-metílico – ASM) L de meio BDA⁻¹ e, finalmente, o controle negativo que consistiu de meio BDA puro (concentração zero). A utilização do Bion® como controle se justifica pela ideia futura de comparar o extrato de algas e o fosfito com esse produto, o qual é registrado no Brasil como ativador da resistência em vegetais. Após as incorporações, os meios foram vertidos em placas de Petri de acrílico, 80 mm de diâmetro, e, quando solidificados, discos de micélio de 5 mm, contendo estruturas do fungo, foram transferidos para o centro dessas placas. Após as repicagens, os tratamentos foram incubados em câmaras tipo BOD, 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h gerado por lâmpadas fluorescentes.

As avaliações foram diárias, sempre no mesmo período do dia e feitas até que uma das parcelas atingisse o bordo da placa, o que aconteceu no sétimo dia após a montagem do ensaio. Ao longo das observações, foram tomadas medidas (cm), com auxílio de paquímetro digital, do crescimento das colônias, em dois sentidos diametralmente opostos. O experimento continha cinco repetições por tratamento e foi adotado o delineamento inteiramente casualizado na condução dos testes, sendo avaliado o efeito de cada produto sobre o fungo de maneira independente. Após, as médias do 6º dia de observação foram calculadas e submetidas à análise de variância, sendo estas comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, a correlação do efeito dos produtos sobre o crescimento micelial do fungo

foi estabelecida por meio de análise de regressão polinomial, sendo considerada alta correlação, valores de $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008).

2.2.2.2. Microscopia eletrônica de varredura do micélio

Placas contendo *C. gloeosporioides* crescido, nas maiores concentrações dos produtos avaliados e na ausência destes (controle negativo), foram destinadas à análise de microscopia eletrônica de varredura. Assim, fragmentos retirados dos bordos das colônias foram mergulhados em solução de Karnovsky (fixadora) contendo glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 2,0%, tampão fosfato 0,05 M, pH = 7,2, em seguida, levados ao vácuo para a retirada do ar intermicelial. Após esse procedimento, as amostras foram incubadas por 12 h na geladeira. Passado esse período, a solução fixadora foi retirada e os fragmentos, então, lavados em tampão cacodilato 0,05 M, pH = 7,0, por 10 min. Em seguida, o tampão anterior foi substituído por quantidades iguais de tampão cacodilato 0,01 M, pH = 7,0 e solução de tetróxido de ósmio 1,0% e as amostras permaneceram em repouso por mais 1 h. Após, a mistura foi retirada e os fragmentos de meio de cultivo contendo o micélio do fungo, foram desidratados em concentrações crescentes de acetona. Assim, cada fragmento foi exposto às concentrações de 30% por 20 min, 50% por 20 min, 70% por 2 h, 90% por 20 min e três vezes a 100% por 20 min sendo, imediatamente após o término desta última etapa, levados ao ponto crítico. Finalizado o passo anterior, os stubs foram montados e metalizados, sendo, finalmente, visualizados em microscópio eletrônico de varredura (Kitajima & Tanaka, 2011).

2.2.2.3. Determinação da massa fresca do micélio

Para a determinação da massa fresca do micélio de *C. gloeosporioides*, em gramas, o fungo foi posto para crescer em meio de cultivo BD (batata-dextrose), acrescido do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio nas mesmas concentrações utilizadas em 2.2.2.1. Para isso, cinco discos de micélio contendo estruturas do patógeno, foram depositados em Erlenmeyers contendo 100 mL das preparações. Nesse ensaio também foram utilizados os controles positivos com a estrobilurina e o ASM, além do controle negativo que consistiu apenas do meio de cultivo BD. Terminada as repicagens, os frascos foram incubados em agitador orbital por 7 dias, em condições de temperatura controlada, 25 ± 2 °C, escuro contínuo e velocidade de rotação de 150 rpm. Após 7 dias de incubação, as preparações foram filtradas em filtro de porcelana forrado com papel Whatman® nº 40, acoplado a um Kitassato e bomba a vácuo, sendo, dessa maneira a massa fresca do micélio determinada.

O experimento continha cinco repetições por tratamento e foi adotado o delineamento inteiramente casualizado na condução dos testes, sendo avaliado o efeito de cada produto sobre o fungo de maneira independente. Após as pesagens, as médias dos valores obtidos foram calculadas e submetidas à análise de variância, sendo estas comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, a correlação do efeito dos produtos sobre a massa fresca micelial do fungo foi estabelecida por meio de análise de regressão polinomial, sendo considerada alta correlação, valores de $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008).

2.2.2.4. Esporulação

As placas de Petri contendo estruturas do patógeno, obtidas no ensaio descrito em 2.2.2.1., foram utilizadas para a determinação do efeito dos produtos sobre a esporulação do patógeno. Dessa maneira, ao final do referido ensaio, cada placa foi individualmente inundada com água destilada (20 mL) e teve as estruturas do patógeno ali

crescidas delicadamente raspadas com o auxílio de um pincel de cerdas macias. As suspensões obtidas foram filtradas em gaze para a obtenção de suspensões apenas de conídios, sendo, estas últimas, ajustadas para um volume de 100 mL. Em seguida, o número de conídios de cada suspensão foi quantificado com o auxílio de um hemacitômetro tipo Neubauer e a quantidade de propágulos em cada parcela expressa em número de conídios mL⁻¹ x 10⁶.

2.2.2.5. Germinação e fixação do conídio

Para a determinação da interferência do extrato de *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a capacidade de germinação e fixação de conídios do fungo *C. gloeosporioides*, discos de micélio de 5 mm de diâmetro foram repicados para placas de Petri contendo meio de cultivo BDA. Em seguida, essas placas foram incubadas em câmaras tipo BOD, ajustadas para uma temperatura média de 25±2 °C e fotoperíodo de 12 h, gerado por lâmpadas fluorescentes. Após o crescimento e esporulação das colônias, os ensaios foram realizados.

Para a análise da germinação, suspensões de conídios foram preparadas nas mesmas concentrações dos produtos utilizadas em 2.2.2.1., contudo, neste ensaio, não foram utilizados os controles com a estrobilurina e o ASM, sendo somente utilizado o controle negativo (suspensão de conídios sem os produtos). Após ajuste da concentração dos propágulos para 10⁴ conídios mL⁻¹, 20 mL das preparações foram vertidos em placas de Petri de acrílico, previamente marcadas com 25 campos de área medindo 1 mm² cada, conforme ilustrado na Figura 2.4., sendo estas, em seguida, incubadas em câmaras tipo BOD, a uma temperatura média de 25±2 °C e fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Transcorrido esse período, a suspensão de conídios foi descartada e, com auxílio de microscopia de luz, 50 conídios por campo marcado foram contados e separados em: (A) conídios germinados, com tubo germinativo maior do que o comprimento do propágulo; (B) conídios não germinados ou com tubo germinativo menor do que o comprimento do propágulo. Foram contados 4 campos da placa, totalizando 200 conídios por parcela. A porcentagem de conídios germinados foi determinada segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de conídios germinados} = \frac{\Sigma A * 100}{\Sigma (A+B)}$$

Em que 'ΣA' representa o somatório do número de conídios germinados e 'Σ(A+B)' representa o somatório número total de conídios contados na parcela.

Figura 2.4. Representação esquemática do ensaio da interferência do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfite de potássio sobre a germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, 24 h após a incubação dos propágulos em diferentes concentrações dos produtos. **1.** Placa de Petri deacrílico, previamente marcada e com as suspensões de conídios; **2.** Campos marcados no fundo da placa. Os pontos nos quatro campos da extremidade representam os campos em que foram contados 50 conídios, totalizando 200 propágulos por parcela; **3.** Visualização dos campos por microscopia de luz, destacando (**A**) os conídios germinados, com tubo germinativo maior do que o comprimento do propágulo e (**B**) os conídios não germinados ou com tubo germinativo menor do que o comprimento do propágulo

A interferência dos produtos sobre a capacidade de adesão dos conídios de *C. gloeosporioides* foi determinada utilizando a mesma técnica das placas marcadas. Para isso, suspensões de conídios foram preparadas nas concentrações dos produtos, propostas em 2.2.2.1., contudo, neste ensaio, não foram utilizados os controles com a estrobilurina e o ASM, somente o controle negativo (suspensão de conídios sem os produtos). Após ajuste da concentração dos propágulos para 10^4 conídios mL^{-1} , 20 mL das preparações foram vertidos em placas de Petri deacrílico, previamente marcadas com 25 campos de área medindo 1 mm^2 cada, conforme ilustrado na Figura 2.5., sendo estas, em seguida, incubadas em câmaras tipo BOD, a uma temperatura média de $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h, por 24 h. Após esse período, cinco campos tiveram todos os conídios contados por duas vezes, sendo: (A) contagem dos conídios antes e (B) após a lavagem das placas, por 5 s, em água corrente. A porcentagem de conídios aderidos foi calculada segundo a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de conídios aderidos} = \frac{B \cdot 100}{A}$$

Em que ‘A’ representa o número de conídios na contagem A e ‘B’ representa o número de conídios na contagem B.

Figura 2.5. Representação esquemática do ensaio da interferência do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a aderência de conídios de *C. gloeosporioides*, 24 h após a incubação dos propágulos em diferentes concentrações dos produtos. 1. Placa de Petri de plástico, previamente marcada e com as suspensões de conídios; 2. Campos marcados no fundo da placa. Os pontos marcados nos cinco campos representam a área de contagem dos conídios antes (A) e após (B) a lavagem das placas em água corrente

Para os dois ensaios descritos acima, foram utilizadas cinco repetições por tratamento. As médias obtidas foram calculadas e o efeito das concentrações dos produtos sobre cada parâmetro avaliado foi verificado, de modo independente, por meio de análise de regressão linear.

2.2.3. Fisiologia da hifa de *C. gloeosporioides* sob a ação do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio

2.2.3.1. Efeito dos produtos sobre a condutividade elétrica da membrana plasmática

Para medir o efeito dos produtos sobre a condutividade elétrica da membrana plasmática, 1 g de micélio fresco foi colocado em contato com 100 mL das concentrações dos produtos preparadas em solução de sacarose (0,2 M), tanto para o extrato de *A. nodosum* quanto para o fosfito de potássio, seguindo as mesmas concentrações utilizadas em 2.2.2.1. O sistema foi posto em contato com uma sonda de condutivímetro e a condutividade elétrica aferida a cada 30 s, por 10 min, sendo os valores expressos em $\mu\text{S/g}$ de micélio fresco. O triton X-100 foi utilizado como controle positivo do teste e neste ensaio, os tratamentos com a estrobilurina e o ASM não foram utilizados.

Foram utilizadas cinco repetições por tratamento e o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. As médias obtidas nos últimos 30 s de leitura foram calculadas e comparadas por análise de variância, sendo aplicado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). O efeito das concentrações dos produtos sobre cada parâmetro avaliado foi verificado, de modo independente, por meio de análise de regressão polinomial.

2.2.3.2. Conteúdo total de proteína e atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase no micélio do fungo

Para a dosagem do conteúdo total de proteínas, da atividade da enzima β -1,3-glucanase e da enzima quitinase, 5 discos de micélio contendo estruturas do patógeno foram transferidos para Erlenmeyers contendo 100 mL de meio de cultivo BD acrescido das diferentes concentrações do extrato da alga e do fosfito de potássio, as mesmas descritas em 2.2.2.1. Além desses tratamentos, foram utilizados como controles positivos do ensaio, um tratamento contendo 150 μg de Amistar® (estrobilurina) L de meio BD⁻¹ e outro que continha 50 mg de Bion® (acibenzolar-S-metilico – ASM) L de meio BD⁻¹, além do meio de cultivo BD puro que consistiu no controle negativo do teste. As

preparações foram incubadas em agitador orbital, sob condições de escuro contínuo, 25 ± 2 °C e 150 rpm, por sete dias. Ao final desse período, o micélio de *C. gloeosporioides* crescido foi destinado à preparação do extrato proteico. Assim, 1,0 g de micélio fresco do fungo, de cada parcela experimental, foi macerado na presença de nitrogênio líquido, seguido da adição de 4,0 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0). Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 25 min, a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação do conteúdo total de proteínas e da atividade da enzima β -1,3-glucanase.

Para a determinação da atividade da quitinase, após a maceração de 1,0 g do micélio fresco do fungo em nitrogênio líquido, a suspensão recebeu 4,0 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,8), contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1 mM de diclorodifenilcloroetano (DDT) e 50 mM de ácido ascórbico. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 25 min, a 4 °C e o sobrenadante coletado para a determinação enzimática, segundo protocolo proposto por Moerschbacher et al. (1988), adaptado por Guzzo & Martins (1996).

Conteúdo total de proteínas – O conteúdo total de proteínas do micélio crescido nos diferentes tratamentos foi quantificado de acordo com Bradford (1976). Para tanto, 800 μ L de extrato proteico, preparado em tampão fosfato, recebeu 200 μ L do reagente de Bradford. Após 5 min, a absorbância foi determinada a 595 nm. A concentração de proteínas foi expressa em equivalentes mg de albumina de soro bovino (ABS) g⁻¹ de amostra, sendo essa concentração determinada com base em curva padrão de ASB.

Atividade da enzima β -1,3-glucanase – A atividade desta enzima foi realizada segundo Kombrink & Hahlbrock (1986). Dessa maneira, o extrato proteico preparado em tampão fosfato foi utilizado nas seguintes reações: **reação** (1) – 150 μ L de laminarina 0,2%, previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), acrescido de 100 μ L do extrato proteico; **controle da reação** (2) – 150 μ L de laminarina 0,2%, previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), mais 100 μ L do extrato proteico e 125 μ L de ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico); **branco** (3) – 150 μ L de laminarina 0,2%. As amostras foram incubadas a 40 °C por 4 h. Após, foram adicionados 125 μ L de ADNS aos tubos da reação (1) e do branco (3) e todas as amostras foram, então, incubadas a 95 °C por 5 min, seguidas de resfriamento em gelo. Após esse passo, as amostras receberam 1,5 mL de água e a absorbância da glicose liberada foi determinada espectrofotometricamente a 410 nm, sendo esta obtida pela subtração da **reação** (1), glucanases hidrolisam a laminarina liberando glicose, com o **controle da reação** (2), glucanases tratadas com ADNS não hidrolisam a laminarina. Os resultados foram expressos em μ g de glicose min⁻¹ mg de proteína⁻¹.

Atividade da enzima quitinase – Inicialmente, foi obtida a quitina coloidal (substrato para a quitinase) pela mistura de 10 g de quitina comercial, 100 mL de ácido fosfórico 85% e 2 L de água destilada. Após, 25 g da quitina coloidal obtida foram acrescidos de 100 mL de Remazol Brilliant Blue R (RBB Sigma®) e 25 mL de uma solução de dicromato de sódio 1,5% e tartarato de sódio e potássio 1,5%. Assim, a atividade desta enzima na hifa de *C. gloeosporioides* foi determinada pela mistura de 100 mg de substrato para quitinase, 800 μ L de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 5,0) e 100 μ L do extrato proteico preparado em tampão borato de sódio. O homogenato foi colocado em banho maria, 100 °C, por 5 min e, após, centrifugado a 7000 g por 10 min. O sobrenadante obtido, foi levado ao espectrofotômetro e a absorbância das amostras determinada a 595 nm. A atividade da enzima foi determinada em curva padrão de proteína, sendo expressa em unidade de quitinase mg de proteína⁻¹ (Guzzo & Martins, 1996).

Todos os tratamentos descritos acima continham cinco repetições e o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. As leituras, para cada parcela, foram realizadas em triplicada. Os valores obtidos foram transformados em médias e estas comparadas pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$. A correlação das concentrações utilizadas dos produtos *versus* o parâmetro analisado, foi determinada a partir de análise de regressão polinomial, sendo

considerados valores altamente correlacionados nos casos em que $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.2.3.3. Efeito do extrato de *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a capacidade celulolítica de *C. gloeosporioides*

Inicialmente, o fungo *C. gloeosporioides* foi repicado para 100 mL do meio de cultivo Melin Norkrans Modificado (MNM) líquido (Marx, 1969), acrescido das concentrações utilizadas em 2.2.2.1. para o extrato de *A. nodosum* e para o fosfito de potássio, além dos controles com a estrobilurina, o ASM e controle negativo (meio MNM sem acréscimo dos produtos). Para induzir a produção da enzima, a glicose do meio foi substituída por celulose microcristalina a 1%. Assim, cinco discos de micélio contendo estruturas do patógeno, com 7 dias de crescimento em MNM sólido, foram colocados em Erlenmeyers, os quais permaneceram a 28 ± 2 °C no escuro, sob agitação constante (150 rpm), durante 30 dias. Para a obtenção das fontes enzimáticas, com auxílio de pipeta automática, foram coletadas alíquotas de 5 mL do meio de cultivo, a cada 6 dias, e conservadas a -20 °C, sendo, posteriormente, utilizadas em ensaios da atividade celulolítica.

Atividade da enzima exo- β -1,4-glucanase – Para a determinação da atividade desta enzima, foi utilizado o método espectrofotométrico indireto, tendo como base a liberação de moléculas de glicose a partir do substrato celulose microcristalina (Schwan-Estrada et al., 2003). O método baseia-se na reação de 50 μ L da fonte enzimática e 450 μ L de celulose microcristalina a 1% em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH = 5,0). A mistura foi, então, incubada por 30 min a 50 °C e a reação interrompida com adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico 1% (HAPHB) em álcali (0,5 g de HAPHB dissolvido em 10 mL de HCl 0,5 M, acrescido de 40 mL de NaOH 0,5 M). Após incubação, a mistura foi mantida a 100 °C por 5 min e, em seguida, resfriada em gelo (Lever, 1972). A leitura de absorbância foi realizada a 410 nm. Foram utilizadas quatro repetições por amostra e o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. As leituras de absorbância das amostras, realizadas em triplicata, foram plotadas em curva padrão para a glicose e a atividade enzimática específica foi expressa em mg de glicose min^{-1} mg de proteína⁻¹.

Atividade da enzima endo- β -1,4-glucanase – Para a produção da endo- β -1,4-glucanase foi utilizado como indutor, a carboximetilcelulose (CMC) a 1%, adicionada em meio líquido MNM. As condições de cultivo e tratamentos avaliados foram as mesmas descritas para a exo- β -1,4-glucanase. A atividade enzimática foi determinada por espectrofotometria indireta, utilizando-se hidrazida do ácido β -hidroxibenzoico 1% (HAPHB) para dosagem de glicose liberada pela ação da enzima sobre CMC (Lever, 1972). A reação consistiu em 50 μ L da fonte enzimática (obtida da mesma forma que exo- β -1,4-glucanase) e 450 μ L de CMC 1% em tampão de acetato de sódio 0,05 M (pH = 5,0). Após 30 minutos de incubação, a 50 °C, a reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de HAPHB. Em seguida, aquecida a 100 °C por 5 min e resfriada em gelo. A absorbância da mistura foi determinada a 410 nm (Schwan-Estrada et al., 2003). Foram utilizadas quatro repetições por amostra e o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. As leituras de absorbância das amostras, realizadas em triplicata, foram plotadas em curva padrão para a glicose e a atividade enzimática específica foi expressa em mg de glicose min^{-1} mg de proteína⁻¹.

Atividade da enzima β -glicosidase – Para esta enzima, foram utilizadas a celobiose 1,0% e a carboximetilcelulose 1,0%, tanto como indutoras da produção da enzima, bem como fontes de carbono no meio de cultivo MNM, mantendo-se, como descrito anteriormente, as mesmas condições de incubação do fungo e coleta de alíquotas das parcelas, além da utilização dos mesmos tratamentos. A determinação da atividade enzimática foi feita através do *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo como substrato. A mistura da reação, incubada a 50 °C por 30 minutos, consistiu de 300 mL de *p*-nitrofenil- β -D-glucopiranosídeo 0,02 M em tampão acetato de sódio 0,05 M (pH = 5,0) e

200 μL da fonte enzimática. Após a incubação, com o objetivo de paralisar a reação, foram adicionados 500 μL de solução Na_2CO_3 a 1 M. O *p*-nitrofenol (*p*-NP) liberado, como resultado da reação enzimática, foi determinado espectrofotometricamente a 405 nm (Schwan-Estrada, 2003). Foram utilizadas quatro repetições por amostra e o delineamento adotado foi inteiramente casualizado. As leituras de absorbância foram plotadas em curva padrão para *p*-nitrofenol e os resultados da atividade específica expressos em $\text{mg de } p\text{-NP min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$.

Os valores obtidos para cada ponto de coleta das enzimas foram transformados em médias e estas comparadas pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$. A correlação das concentrações dos produtos utilizadas *versus* o parâmetro analisado, foi determinada a partir de análise de regressão polinomial, sendo considerados valores altamente correlacionados nos casos em que $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

2.3. Resultados E Discussão

2.3.1. Avaliação do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio sobre a morfologia do fungo *C. gloeosporioides*

A avaliação do crescimento micelial das colônias de *C. gloeosporioides*, na presença das diferentes concentrações dos produtos, mostrou que o extrato de *A. nodosum* não interfere neste parâmetro, uma vez que não se observou diferenças significativas entre os tratamentos com o produto e o controle negativo (concentração zero). Tanto a estrobilurina, quanto o ASM inibiram o desenvolvimento do fungo em relação aos demais tratamentos, sendo, a estrobilurina o controle de maior interferência sobre o crescimento das colônias. A análise de regressão polinomial aplicada aos tratamentos com o produto e o controle negativo evidenciou a baixa correlação do fator “concentração” do extrato *versus* o diâmetro médio das colônias ($R^2 = 0,37$). Esses resultados estão representados na Figura 2.6.A.

Diferentemente do extrato de algas, o fosfito de potássio, interferiu de modo significativo no desenvolvimento das colônias, uma vez que se observou diâmetros menores para todas as concentrações do produto utilizadas, quando comparadas com o controle negativo. As parcelas que receberam a estrobilurina foram as que mais sofreram interferências e apresentaram os menores valores para o parâmetro analisado. A análise de regressão polinomial, aplicada aos tratamentos com o produto, permitiu verificar que o aumento progressivo das concentrações de fosfito utilizadas, está altamente correlacionado com esse parâmetro, uma vez que o aumento da concentração de fosfito refletiu em diminuição do desenvolvimento diametral da colônia do fungo ($R^2 = 0,83$) (Figura 2.6.B).

Figura 2.6. Diâmetro médio das colônias do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após seis dias de incubação em meio de cultivo BDA, acrescido de diferentes concentrações (%) do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B), além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

A análise visual do perfil das colônias comprova o que foi observado nas análises estatísticas. Dessa maneira, conforme demonstrado na Figura 2.7., as placas que receberam as diferentes concentrações do extrato da alga (Figura 2.7., linha A), apresentam perfil de crescimento micelial semelhante ao controle negativo (Figura 2.7.CN). O contato das hifas com concentrações crescentes do fosfito de potássio (Figura 2.7., linha B) induziu a formação de um micélio mais fino e menos denso, quando comparado aos demais tratamentos. Tanto a estrobilurina (Figura 2.7.E) quanto o acibenzolar-S-metílico (Figura 2.7., ASM) foram, visualmente, os controles com maior potencial fungistático do teste.

Figura 2.7. Perfil do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* submetido a diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (linha **A**) e do fosfito de potássio (linha **B**), após 7 dias de incubação. CN – Controle negativo; ASM – acibenzolar-S-metílico; E – Estrobilurina

A análise, por microscopia eletrônica de varredura, da região periférica do micélio de *C. gloeosporioides*, crescido em meio de cultivo BDA acrescido das maiores concentrações dos produtos avaliados, representada na Figura 2.8, evidencia o efeito promotor de crescimento da hifa por parte do extrato de algas (Figura 2.8.A), uma vez que se observa um maior adensamento do micélio quando na presença desse produto, comparado ao fosfito (Figura 2.8.B) e ao controle negativo (Figura 2.8.C).

Figura 2.8. Micrografia eletrônica de varredura das hifas do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* crescido nas concentrações de 1,0% do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e 0,4% do fosfito de potássio (B), respectivamente, em relação ao controle negativo (C), após 7 dias de cultivo. As barras, na parte superior da figura, representam 100 μm do real

Utilizando um maior aumento e analisando a região mais central da colônia, é possível se observar a estrutura miceliana bem desenvolvida, quando na presença do extrato da alga, e ainda em desenvolvimento, quando o fungo foi crescido em meio de cultivo BDA contendo o fosfito de potássio (Figura 2.9.).

Figura 2.9. Micrografia eletrônica de varredura de colônias do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* crescidas em meio de cultivo BDA, acrescido de 1,0% extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e de 0,4% do fosfito de potássio (B), após 7 dias de cultivo. As setas sobre a parte 'B' da figura indicam os pontos de brotamento de novas hifas, pouco observados em 'A'. As barras na parte superior da figura representam 20 μm do real

Os dados obtidos a partir da análise da massa fresca do micélio de *C. gloeosporioides*, cultivado em meio BD por sete dias, complementam aquilo que foi descrito acima, uma vez que, para o extrato da alga, o que se observou foi um aumento significativo desse parâmetro quando o fungo foi cultivado nas concentrações de 0,5% e 1,0%, em relação ao tratamento que não recebeu os produtos. A concentração 0,1% inibiu o desenvolvimento do microrganismo e a concentração de 0,3% não diferiu estatisticamente do controle (Figura 2.10.A). Com relação ao fosfito de potássio, somente a concentração de 0,1% do produto diferiu do controle, diminuindo os valores de massa fresca analisados (Figura 2.10.B).

A análise de regressão polinomial dos tratamentos que receberam concentrações crescentes do extrato e do fosfito, realizada de modo independente para cada produto, indicou alta correlação da concentração *versus* massa fresca do micélio para o ensaio realizado com o extrato da alga ($R^2 = 0,81$). Assim, concentrações crescentes do extrato resultaram em aumentos progressivos da produção de massa fresca de *C. gloeosporioides*. O baixo valor de R^2 ($R^2 = 0,387$), observado nos ensaios com o fosfito, indica que as concentrações utilizadas neste teste e nas condições em que este experimento foi conduzido, pouco interferem sobre esse parâmetro. Em ambos os casos, os controles feitos com a estrobilurina e o ASM foram significativamente mais eficientes no que concerne à inibição da formação do micélio fúngico (Figura 2.10).

Figura 2.10. Massa fresca, em gramas, do micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, após sete dias de cultivo em meio BD acrescido das diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B), além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

Extratos de algas marinhas têm demonstrado efeito sobre o crescimento de ampla gama de fungos fitopatogênicos (Coşoveanu et al., 2010; Jiménez et al., 2011; Ambika & Sujatha, 2014, 2015). Coşoveanu et al. (2010), demonstraram reduções no diâmetro médio das colônias dos fungos *Fusarium roseum*, *F. oxysporum*, *Alternaria alternata*, *A. dauci*, *A. longipes*, *Trichoderma viride*, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger* e *Penicillium expansum*, que variaram entre 50% e 90%, quando na presença dos extratos das macroalgas *Alaria esculenta*, *Fucus vesiculosus*, *Fucus* sp. e *Ecklonia maxima*, todos disponíveis comercialmente. Peres et al. (2012), obtiveram resultados que contrastam com os observados nestes ensaios, uma vez que os autores observaram efeito supressivo do extrato alcoólico da alga marinha *A. nodosum* sobre o crescimento do fungo *Colletotrichum lagenarium*. Contudo, o extrato não teve efeito significativo na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus flavus*. Em *Monilinia fructicola*, o extrato de *A. nodosum* apresentou respostas semelhantes às observadas nestes ensaios. O produto induziu o crescimento micelial do fungo e esse incremento foi proporcional ao aumento das doses do extrato aplicadas (Oliari et al., 2014).

Os estudos realizados por Colapietra & Alexander (2006) comprovam a eficiência dos extratos de *A. nodosum* como bioestimulantes. Ainda, segundo especificações do fabricante, a alga é reconhecida por ser excelente na complementação de hormônios de crescimento (auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico), aminoácidos (alanina, ácido aspártico e glutâmico, glicina, isoleucina, leucina, lisina, prolina, tirosina, triptofano e valina), nutrientes importantes (N, P, K, Ca, Mg, S, B, Fe, Mn, Cu e Zn) e apresenta um pH que varia de 7,8 a 8,2 (Norrie & Keathley, 2005). Tais características também foram apontadas por Limberger & Gheller (2012) e explicam a não interferência do produto no desenvolvimento micelial das colônias e o estímulo para a produção de massa fresca micelial, observado nos ensaios.

Roma (2013) destaca o efeito fungitóxico do fosfito de potássio sobre o crescimento micelial dos fungos *Rhizopus stolonifer*, *B. cinerea* e *C. gloeosporioides*, este último, agente causal da podridão da uva madura. A pesquisa citada evidencia o efeito do produto sobre o desenvolvimento dos fungos a partir da concentração de 2,5 mL L⁻¹, sendo observada, nessa concentração, uma inibição do desenvolvimento das estruturas vegetativas do patógeno na faixa de 60%. Outros trabalhos destacam o efeito *in vitro* do fosfito de potássio sobre fitopatógenos importantes, como os fungos *Penicillium expansum* e *Alternaria alternata* (Reuveni et al., 2003; Amari & Bompeix, 2011). A avaliação de diferentes produtos comerciais a base de fosfito de potássio indicou a capacidade desse sal em reduzir a incidência de fungos em sementes de soja (Medeiros et al., 2017). Segundo dados obtidos pelos autores, os produtos Yantra® e Reforce®, quando comparados ao controle, reduziram a incidência de fitopatógenos em 66,5% e 73,3%, respectivamente. Sais de potássio também foram eficientes no controle da fusariose do abacaxizeiro no campo, com taxas de redução da doença de 97,67% (Melo et al., 2016).

Segundo o FRAC (*Fungicide Resistance Action Committee*), o modo de ação do ácido fosforoso e seus derivados ainda é desconhecido (FRAC, 2017). Contudo, pesquisas vêm demonstrando que os fosfitos causam o rompimento das paredes e membranas celulares dos patógenos e têm capacidade de inibir o crescimento de hifas por alterarem alguns genes responsáveis pela codificação de proteínas envolvidas com o processo de biossíntese da parede celular, síntese de aminoácidos, metabolismo de proteínas e de energia, além de desintoxicação e estresse oxidativo, com isso, extenuando a morfologia e fisiologia dos patógenos (King et al., 2010; Dalio et al., 2014; Medeiros et al., 2016; Melo et al., 2016).

A quantificação da esporulação nas placas do teste de crescimento de *C. gloeosporioides*, na presença dos produtos, demonstrou que o extrato da alga interfere de modo significativo sobre este parâmetro, induzindo a esporulação das hifas conidiogênicas (Figura 2.11.A). O tratamento que continha 1,0% do extrato foi o que possuía maior número de conídios por mL e também, foi o único, dentre as concentrações de *A. nodosum* utilizadas, que diferiu significativamente do controle negativo (tratamento sem o produto). Com relação ao fosfito de potássio, apenas a concentração de 0,1% diferiu do controle negativo, reduzindo a esporulação do patógeno (Figura 2.11.B). Todas as demais concentrações de fosfito utilizadas foram estatisticamente iguais ao tratamento sem o produto.

Adicionalmente, pode-se afirmar que o aumento progressivo das concentrações do extrato da alga implicou em incrementos também progressivos na esporulação do fungo, fato comprovado pela análise de regressão polinomial ($R^2 = 0,97$). Entretanto, o mesmo não pode ser afirmado para o fosfito de potássio, uma vez que, as concentrações utilizadas neste ensaio e nas condições em que estes testes foram desenvolvidos, pouco interferiram no parâmetro analisado ($R^2 = 0,338$). Tanto no ensaio com o extrato quanto com o fosfito, o fungicida estrobilurina e o ASM foram mais eficientes em inibir ou reduzir a esporulação do fungo (Figura 2.11.).

Figura 2.11. Esporulação do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, expressa em número de conídios $\text{mL}^{-1} \times 10^6$, após sete dias de crescimento em concentrações (%) crescentes do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B), além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

Saber dos efeitos de produtos aplicados às lavouras, ou em frutos na fase de pós-colheita, sobre a esporulação de fungos filamentosos é de grande importância para fitopatologistas e produtores uma vez que o esporo, quando disseminado e depositado sobre a superfície de um hospedeiro suscetível, é um propágulo com potencial de causar doença no tecido sadio. Em um desenvolvimento biológico normal, fungos filamentosos produzem conídios após a parada do crescimento vegetativo. Em condições axênicas, a esporulação desses indivíduos é modulada, também, pelo esgotamento nutricional dos meios de cultivo ou por estresses diversos como, por exemplo, a alta concentração de moléculas orgânicas e inorgânicas (Dahlberg & Etten, 1982; Wulandari et al., 2009; Braun et al., 2011). Uma das hipóteses levantadas para explicar o início do processo está na provável existência de sensores que sinalizam, para a célula conidiogênica, o status nutricional do meio (Roncal & Ugalde, 2003; Su et al., 2012).

Oliari et al. (2014) não verificaram interferência do extrato de *A. nodosum* sobre a esporulação de *M. fructicola*. Contudo, Mattner et al. (2014) destacam que o extrato da referida alga induz a esporulação de fungos devido ao alto pH que o produto apresenta, o que causa estresses no microrganismo, levando-o à formação de propágulos infectivos. Liu et al. (2005), variando os pHs de 3 a 10 demonstraram *in vitro* que *C. gloeosporioides*, isolado de lichia, apresenta maior crescimento micelial numa faixa de pH que varia entre 5 e 6 e maior esporulação e germinação de conídios, entre pH 6,0 e 7,0, evidenciando, assim, que faixas de pH mais próximas à basicidade induzem a esporulação do fungo. O Acadian® é um produto que apresenta pH básico, variando entre 7,8 e 8,2 (Acadian, 2009), valores que favorecem a esporulação do fungo. Além disso, outras pesquisas destacam que o estresse microbiano na presença do extrato ocorre devido à presença de ácidos graxos com atividade antimicrobiana (Sieburth, 1964; Hornsey & Hide, 1976), compostos fenólicos (Haug & Larsen, 1958; Audibert et al., 2010) e betaínas (Wu et al., 1998).

Para o fosfito de potássio, Caixeta et al. (2012) observaram ação inibitória do produto sobre *C. lindemuthianum* e *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli*, patógenos importantes na cultura do feijoeiro. Os autores ainda destacam que, dependendo da espécie, o produto tem comportamento diferencial sobre o parâmetro e que diferentes concentrações dos produtos comerciais à base de fosfito, disponíveis no mercado, devem ser testadas para diferentes fungos, cobrindo, assim, o maior número de espécies fúngicas de importância econômica. Em uma concentração de 10 mL L^{-1} de Phytogard®, valor 2,5 vezes maior do que a maior concentração utilizadas nestes ensaios, Roma (2013) observou inibição da esporulação em, aproximadamente, 100% para os fungos *Rhizopus stolonifer* e *C. gloeosporioides*. A inibição da esporulação tem sido apontada como um dos alvos dos fosfitos (Deliopoulos et al., 2010), contudo, concentrações diferentes e maiores do produto devem ser testadas para essa finalidade, inclusive, para o controle de *C. gloeosporioides* isolado de mangas.

O efeito do extrato de algas e do fosfito de potássio sobre a germinação e fixação dos conídios de *C. gloeosporioides* está demonstrado na Figura 2.12. De modo geral, os dois produtos interferem sobre os dois parâmetros analisados e, a partir do que foi observado pelas análises de regressão polinomial aplicadas nos testes, pode-se dizer que, à medida que se aumentou a concentração dos produtos, nas condições em que estes ensaios foram conduzidos, houve interferências progressivas tanto no percentual de germinação quanto no percentual de fixação do propágulo infectivo do fungo.

Figura 2.12. Porcentagem de germinação (A e B) e porcentagem de adesão (C e D) de conídios do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob a ação de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio. As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Ribeiro et al. (2016), avaliando o efeito do Acadian® sobre o fungo *C. gloeosporioides* em mamões, na fase de pós-colheita, verificaram que o produto foi eficiente em inibir a germinação dos conídios do fungo, nas duas concentrações testadas, 40 mL L⁻¹ e 60 mL L⁻¹, valores 4 e 6 vezes maiores do que a maior concentração utilizada nos ensaios aqui descritos. De modo semelhante, Barros et al. (2015) verificaram efeito inibitório do extrato de algas sobre a germinação de conídios de *Alternaria brassicicola*, agente da alternariose em mudas de couve-manteiga. As fucanas, polissacarídeos algais presentes na espécie *A. nodosum*, são apontadas como os agentes de inibição da germinação dos propágulos infectivos de diversos fitopatógenos (Khan et al., 2009; Stadnik & Freitas, 2012) e, sendo estas moléculas os prováveis agentes de inibição da germinação dessas estruturas, estas podem ser apontadas como a possível causa da diminuição da germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* na presença do extrato, observada nestes ensaios.

Há vários registros na literatura do efeito do fosfito de potássio sobre a germinação de conídios de diversos fitopatógenos, como *Verticillium dahliae* (Ribeiro Júnior et al., 2006), *C. musae* (Viana et al., 2012) e *C. tamarilloi* (Alexandre et al., 2014), sendo, os dois últimos, agentes de antracnose em bananas e jiló, respectivamente. Em todos os casos, o produto agiu impedindo a germinação normal das estruturas. Adicionalmente, no trabalho de Lopes (2008), onde se avaliou a ação fungitóxica de diversas formulações de fosfito, disponíveis comercialmente (Fitofós-Mg®, Phytogard K® e Phytogard Ca®), a 50%, 100% e 200% das doses recomendadas pelo fabricante, foi verificado que os

produtos foram eficientes na redução do crescimento micelial, produção e germinação de conídios de *C. gloeosporioides*, em todas as concentrações testadas. Uma das hipóteses levantadas para explicar o potencial dos fosfitos em inibir a germinação de conídios foi proposta por Guest & Grant, (1991) e Malusa & Tosi, (2005). Os autores defendem que o potencial da molécula está atrelado à sua capacidade de se depositar na ponta do tubo germinativo emergente, tecido mais suscetível durante a fase de germinação do fungo, o que paralisa o processo (Araújo et al., 2008).

2.3.2. Fisiologia da hifa de *C. gloeosporioides* sob a ação do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio

Pela análise de condutivimetria da hifa, exposta às diferentes concentrações do extrato de algas e do fosfito de potássio, foi observado que os dois produtos interferem sobre a permeabilidade seletiva da membrana plasmática da estrutura, uma vez que, quanto maior o tempo de exposição do micélio aos produtos, maior foi a condutividade elétrica do sistema, conforme demonstrado na Figura 2.13.

Figura 2.13. Perda de eletrólitos, expressa em $\mu\text{S g}$ de micélio fresco⁻¹, pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após contato com diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B), por 10 min. O triton (Triton X-100), representa o controle positivo do teste

A análise de variância do último tempo de coleta (10 min) comprovou o que foi observado na Figura 2.13. Assim, tanto o extrato da alga quanto o fosfito de potássio foram danosos à membrana plasmática da hifa do fungo, uma vez que todos os tratamentos, nos dois casos, trouxeram prejuízos significativos à membrana plasmática do micélio de *C. gloeosporioides*, expressos pela maior liberação de eletrólitos nos tratamentos com os produtos. Adicionalmente, o extrato de *A. nodosum*, utilizado nas concentrações de 0,5% e 1,0%, alterou significativamente a membrana plasmática do fungo, em proporções maiores, inclusive, às observadas para o detergente laboratorial triton X-100 (Figura 2.14.A). O mesmo não foi observado para o fosfito de potássio (Figura 2.14.B). A análise de regressão polinomial dos ensaios permitiu a observação de que, quanto maior a concentração dos produtos utilizada maior foi a interferência de cada produto sobre o parâmetro analisado. Esses resultados estão apresentados na Figura 2.14.

Figura 2.14. Perda de eletrólitos, expressa em $\mu\text{S g de micélio fresco}^{-1}$, do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, após 10 min de contato com diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A) e do fosfito de potássio (B). O triton (Triton X-100), representa o controle positivo do teste. As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

Células do tipo 'Vero', um tipo celular isolado do tecido epitelial de rins de macacos africanos, muito utilizadas em estudos de respostas citológicas a estresses diversos, foram expostas ao fucoidan e ao ascophyllan, dois polissacarídeos algais extraídos da espécie *A. nodosum* (Jiang et al., 2010). Os autores observaram alto efeito citotóxico dos polissacarídeos a essas células, dentre eles, a perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática das células. Em outro trabalho que avaliou o fucoidan isolado da alga marinha, os autores perceberam que a molécula reduzia a viabilidade e causava apoptose de células geradoras de carcinoma do colo de útero (Foley et al., 2011). As células fúngicas diferem das células utilizadas nos estudos citados pela presença de uma estrutura complexa e rígida: a parede celular composta de quitina e glucana. Contudo, tais pesquisas apontam para uma possível explicação do efeito observado do extrato sobre as membranas celulares das estruturas vegetativas de *C. gloeosporioides*.

O efeito do fosfito sobre as células de *Phytophthora cinnamomi* foi determinado no trabalho de King et al. (2010). Os autores verificaram que a molécula causa distorções nas hifas do oomiceto, lise das paredes celulares e efeitos adversos sobre a estrutura. Isso ocorre porque, a estrutura miceliana na presença de sais de potássio, tem mais de 43 de seus transcritos genômicos modificados pela molécula, sendo, muitos destes transcritos, envolvidos com a síntese da parede celular ou o funcionamento do citoesqueleto do microrganismo. Em outro estudo, foi verificada perda significativa de eletrólitos do fungo *R. stolonifer*, crescido em meio de cultivo BDA, acrescido de diferentes concentrações de fosfito (Roma, 2013). Além disso, análises de microscopia eletrônica de transmissão revelaram que o micélio do fungo sofreu forte desorganização citoplasmática. Tais resultados estão de acordo com o que foi verificado para *C. gloeosporioides*, na presença do fosfito de potássio, neste trabalho.

O conteúdo total de proteínas e a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase no micélio de *C. gloeosporioides*, após sete dias de cultivo em diferentes concentrações do extrato da alga marinha, estão apresentados na Figura 2.15. O que se observou foi que o produto, utilizado nas concentrações de 0,1%, 0,3% e 0,5% pouco interferiu no conteúdo total de proteínas do micélio fúngico. Entretanto, a utilização do extrato na concentração de 1,0%, incrementou significativamente esse parâmetro, quando se comparou esse tratamento com o controle negativo (Figura 2.15.A). A atividade da enzima β -1,3-glucanase foi estatisticamente superior em todos os tratamentos que continham o extrato (Figura 2.15.B) e o mesmo se observou para a atividade da enzima quitinase (Figura 2.15.C). Aumentos crescentes das concentrações do extrato de *A. nodosum* implicaram em aumentos progressivos do conteúdo total de proteínas ($R^2 = 0,993$) e da atividade das enzimas β -1,3-glucanase ($R^2 = 0,958$) e quitinase ($R^2 = 0,966$), indicando que a concentração do produto interfere diretamente no metabolismo da estrutura e, conseqüentemente, no crescimento

da hifa. Nos três parâmetros analisados, tanto a estrobilurina quanto o ASM foram estatisticamente inferiores aos demais tratamentos em termos de atividade proteica/enzimática (Figura 2.15.).

Figura 2.15. Conteúdo total de proteínas (A), atividade da enzima β-1,3-glucanase (B) e atividade da enzima quitinase (C) do micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após sete dias de cultivo em meio BD acrescido de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

Foi verificado que os tratamentos com fosfito de potássio, utilizados neste experimento e nas condições em que estes ensaios foram conduzidos, não foram significativamente diferentes do controle negativo, no que se refere ao conteúdo total de proteínas no micélio do fungo (Figura 2.16.A). Contudo, a enzima β-1,3-glucanase teve a sua atividade significativamente reduzida a partir da utilização do produto (Figura 2.16.B) e de maneira análoga, a enzima quitinase também teve sua atividade diminuída pelas diferentes concentrações do fosfito, destacando-se a concentração de 0,2%, a única, significativamente, menor do que a concentração zero (Figura 2.16.C). O fungicida estrobilurina manteve os teores de proteínas totais e também a atividade das enzimas testadas, em um patamar estatisticamente mais baixo, em relação a todos os demais tratamentos, nas três análises. Em todos os testes realizados, o ASM foi superior à estrobilurina. Contudo, o produto foi inferior a todos os outros tratamentos, com exceção da concentração zero, na análise do conteúdo total de proteínas e atividade da enzima β-1,3-glucanase. Na dosagem da quitinase, observou-se que o ASM foi estatisticamente igual ao controle negativo e superior aos demais tratamentos (Figura 2.16.). A análise de regressão polinomial permitiu a constatação de que o fator ‘concentração do produto’ está altamente correlacionado com as respostas observadas para o conteúdo total de proteínas ($R^2 = 0,735$), atividade da enzima β-1,3-glucanase ($R^2 = 0,947$) e da quitinase ($R^2 = 0,967$). Especialmente para as enzimas, é possível dizer que quanto maior a concentração de fosfito de potássio utilizada, menor foi a atividade enzimática do micélio e, portanto, menor e/ou mais lento foi o crescimento do talo vegetativo de *C. gloeosporioides* (Figura 2.16.).

Figura 2.16. Conteúdo total de proteínas (**A**), atividade da enzima β-1,3-glucanase (**B**) e atividade da enzima quitinase (**C**) do micélio do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* após sete dias de cultivo em meio BD acrescido de diferentes concentrações (%) do fosfito de potássio, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

As proteínas são demandadas pelos fungos, pois além das funções fisiológicas que desempenhas, também podem ser fontes de nitrogênio, carbono e enxofre (Marzluf, 1997). Muitas dessas moléculas estão envolvidas no processo de defesa das plantas (Schwan-Estrada et al., 2008), contudo, em microrganismos, formas ativas de proteínas, as enzimas, são importantes para vários processos, dentre eles, a manutenção da plasticidade da parede celular da hifa (Bartnick-Garcia, 1970). Enzimas específicas participam da biossíntese das moléculas de quitina e glucana que comporão a parede celular (Adams, 2004). Essas enzimas formam longas cadeias de N-acetilglucosamina, unidas por ligações do tipo β-1,4, e glucanas unidas por ligações do tipo β-1,3, respectivamente (Odds et al., 2003; Adams, 2004). Tal organização confere à hifa rigidez e o crescimento da estrutura está condicionado à capacidade do fungo em quebrar, parcialmente, a parede celular para, assim, crescer. Os resultados observados para a atividade da β-1,3-glucanase e quitinase, enzimas responsáveis pela quebra parcial da hifa no momento de crescimento da estrutura, complementam os resultados obtidos para a produção de massa fresca micelial do fungo *C. gloeosporioides*, crescido em meio BD, acrescido de diferentes concentrações do extrato de algas. O aumento da concentração do extrato induziu aumentos na produção de massa fresca da estrutura vegetativa do fungo, portanto, é natural que se tenha observado aumento também, da atividade das enzimas, uma vez que, para crescer, o microrganismo demanda dessas moléculas.

De forma antagônica, mas seguindo o mesmo raciocínio, foi observada redução no diâmetro das colônias do fungo *C. gloeosporioides*, crescido nas diferentes concentrações do sal de potássio. No teste enzimático, observou-se redução da atividade da β-1,3-glucanase e da quitinase, com o aumento das doses do fosfito. Portanto, esses resultados também estão em concordância. Dessa maneira, seguindo a hipótese de quebra, crescimento e reconstituição para o desenvolvimento da parte vegetativa da estrutura fúngica, menor conteúdo miceliano significa, menor atividade de enzimas envolvidas com a lise da estrutura e vice-versa.

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que o extrato da alga *A. nodosum*, nas concentrações e condições aplicadas nestes ensaios, aumenta o crescimento vegetativo de *C. gloeosporioides*, resultando também, em aumento da atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase, responsáveis pela plasticidade da hifa. De forma inversa, o fosfito de potássio interfere no crescimento vegetativo e, portanto, na atividade das referidas enzimas na hifa.

Alguns autores afirmam que as glucanases e quitinases fúngicas não são restritas apenas ao crescimento vegetativo desses microrganismos, estando essas moléculas também associadas à processos de sobrevivência, degradação de polissacarídeos e patogenicidade (Vázquez-Garcidueñas et al., 1998; Noronha & Ulhoa, 2000; Giese et al, 2003). A inibição das enzimas quando na presença do fosfito pode ter ocorrido por fatores diversos. Rana et al. (2003), afirmam que essas moléculas podem ter suas atividades reduzidas na presença de compostos como clorofórmio, benzenoides, organofosforados, quelantes e sais diversos, devido a concentrações elevadas desses produtos no substrato e também de outras moléculas reativas.

O efeito dos produtos sobre a capacidade celulolítica do micélio de *C. gloeosporioides* está representado na Figura 2.17. As análises demonstraram que o pico da ação enzimática se deu no sexto dia de cultivo do fungo no meio MNM, acrescido tanto do extrato da alga marinha quanto do fosfito de potássio, para a α - β -1,4-glucanase, para a α - β -1,4-glucanase e para a β -glicosidase. Nos dias subsequentes, houve diminuição progressiva dessa atividade e, apenas para a β -glicosidase, a partir do 18º dia de incubação, houve novo aumento da atividade da enzima. Tanto o extrato da alga quanto o fosfito diminuíram a capacidade celulolítica do micélio do fungo.

Figura 2.17. Capacidade celulolítica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* sob o efeito de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (A, B e C) e do fosfato de potássio (D, E e F), além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). A e D: atividade da exo-β-1,4-glucanase; B e E: atividade da endo-β-1,4-glucanase; C e F: atividade da β-glicosidase

A análise de variância lançada nos pontos de maior atividade enzimática, para os tratamentos com o extrato de algas, comprovou os perfis observados nos gráficos apresentados na Figura 2.17. Ao sexto dia de cultivo de *C. gloeosporioides* em meio MNM, acrescido das diferentes concentrações do extrato, todos os tratamentos diferiram significativamente do controle negativo (fungo crescido apenas em meio MNM) para a exo-β-1,4-glucanase (Figura 2.18.A), para a endo-β-1,4-glucanase (Figura 2.18.B) e para a β-glicosidase (Figura 2.18.C). Resultado semelhante também foi observado para a avaliação do trigésimo dia de atividade da β-glicosidase (Figura 2.18.D).

Adicionalmente, constatou-se que a adição do fungicida estrobilurina aos meios de cultivo, foi o fator que mais interferiu na atividade celulolítica da hifa. Contudo, a concentração de 1,0% do extrato de *A. nodosum* diminuiu a atividade da β-glicosidase na mesma proporção que o fungicida, no sexto dia (Figura 2.18.C).

Em todos os casos analisados, incrementos progressivos da concentração do extrato implicou em diminuição também progressiva da atividade enzimática, como comprovado pelos altos valores de R^2 da análise de regressão polinomial, todos maiores que 0,90 (Figura 2.18.).

Figura 2.18. Atividade celulolítica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado em meio MNM acrescido de diferentes concentrações (%) do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). (A) Atividade da exo-β-1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (B) atividade da endo-β-1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (C e D) atividade da β-glicosidase ao sexto e trigésimo dia de cultivo, respectivamente. As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

O pico da atividade celulolítica de *C. gloeosporioides*, crescido em meio MNM acrescido das diferentes concentrações de fosfito de potássio, está representado na Figura 2.19. A exo-β-1,4-glucanase, no sexto dia de cultivo do fungo, teve sua atividade significativamente reduzida quando na presença das concentrações 0,3% e 0,4% do fosfito. Tanto o tratamento com ASM quanto as concentrações 0,1% e 0,2% do produto foram iguais estatisticamente ao controle negativo, portanto, não interferiram sobre a atividade da exoglucanase (Figura 2.19.A).

As concentrações 0,2%, 0,3% e 0,4% diminuíram a atividade da endo-β-1,4-glucanase, quando comparadas ao tratamento em que o fungo foi cultivado apenas em meio MNM, no sexto dia de cultivo. Para essa enzima, apenas a concentração de 0,1% do fosfito não interferiu sobre a atividade enzimática. Adicionalmente, as concentrações 0,3% e 0,4% não diferiram do que foi observado para o ASM (Figura 2.19.B).

Finalmente, no sexto dia de cultivo da hifa de *C. gloeosporioides*, a enzima β-glicosidase teve a sua atividade reduzida apenas pela concentração de 0,4% do fosfito em relação ao controle negativo (Figura 2.19.C). Ao trigésimo dia, todas as concentrações diferiram da concentração zero, reduzindo a atividade da celobiase (Figura 2.19.D).

No sexto dia de atividade da enzima, todas as concentrações do produto foram iguais estatisticamente ao tratamento com o ASM, enquanto que, no trigésimo dia, a maior concentração do produto utilizada diferiu do acibenzolar-S-metílico (Figura 2.19.C e D).

Em todos os períodos de atividade enzimática analisados, o tratamento com o fungicida estrobilurina foi o que mais interferiu reduzindo a atividade celulolítica da hifa do patógeno. A análise de regressão polinomial lançada sobre os ensaios mostrou que, as concentrações crescentes do fosfito de potássio, usadas nestes testes, exibem alta correlação com a atividade celulolítica da hifa, uma vez que, concentrações crescentes do produto implicaram em

decréscimos progressivos da atividade das enzimas do complexo de degradação da celulose. Tal fato pode ser constatado ao se observar os altos valores de R^2 , todos maiores que 0,90, apresentados na Figura 2.19.

Figura 2.19. Atividade celulolítica do fungo *Colletotrichum gloeosporioides* cultivado em meio MNM acrescido de diferentes concentrações (%) do fosfato de potássio, além dos controles com o fungicida estrobilurina e com o ASM (acibenzolar-S-metílico). (A) Atividade da exo-β-1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (B) atividade da endo-β-1,4-glucanase ao sexto dia de cultivo; (C e D) atividade da β-glicosidase ao sexto e trigésimo dia de cultivo, respectivamente. As letras minúsculas sobre as colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média e as equações representadas em cada gráfico, a análise de regressão polinomial de cada ensaio

A atividade das celulasas sobre um substrato acontece de modo sinérgico entre as endo e exoglucanases, na qual a atividade de um componente enzimático é favorecida pela ação hidrolítica do outro (Wood, 1985; Ryu & Mandels, 1980). A β-glicosidase é comum em microrganismos e outros seres vivos como plantas, bactérias e tecidos animais, sendo a última a atuar no processo de degradação de celulose (Hirayama et al., 1978). Endo e exoglucanases de um sistema típico de enzima celulase, são inibidas pela presença da celobiose (Guedes et al., 2017), conforme foi observado para as duas enzimas produzidas por *C. gloeosporioides* nos ensaios. A caracterização dessas enzimas, produzidas pela espécie *Magnaporthe oryzae*, agente causal da brusone em trigo, demonstrou alta atividade das moléculas, nos estágios iniciais de produção, com progressivo decréscimo nos dias subsequentes, assim como observado para *C. gloeosporioides* (Van et al., 2012). O processo descrito acima é o modo de ação natural dessas moléculas. Uma vez depositadas sobre o seu substrato, a celulose, essas enzimas começam a ser liberadas pelo fungo e degradam o polímero. Entretanto, como comentado abaixo, alguns trabalhos apontam para o potencial da alga marinha *A. nodosum* em inibir a capacidade celulolítica de fungos e outros microrganismos.

Wang et al. (2008) verificaram *in vitro* que florotaninos, extraídos de *A. nodosum*, reduziram a fermentação ruminal, a degradação celulolítica e proteica da forragem testada. Em trabalho semelhante, Belanche et al. (2016) também verificou que a presença de florotaninos na alga oferecida aos animais como parte suplementar da dieta, reduziu a digestibilidade da forragem em 24% e, por conta disso, houve uma modificação na estrutura da comunidade bacteriana do rúmen dos animais. Assim como nesses casos, foi observado neste trabalho que a alga marinha, aplicada

na forma de extrato, reduziu a atividade celulolítica de *C. gloeosporioides*. Além disso, o cultivo do fungo em concentrações crescentes do extrato implicou em reduções também progressivas da atividade celulolítica do microrganismo. Não há na literatura nenhum trabalho que tenha verificado a interferência do extrato de *A. nodosum* sobre a capacidade celulolítica de fungos fitopatogênicos, de modo que este potencial precisa ser melhor investigado. Assim, esses dados se configuram como algo inédito nesse contexto.

Comportamento semelhante foi observado para o crescimento de *C. gloeosporioides* em diferentes concentrações do fosfito de potássio. Rayes et al. (1999) destacam que sais de sódio prejudicaram a hidrólise da celulose por ser um substrato que inibe parcialmente as celulases. O processo enzimático envolvendo as celulases é bastante complexo, podendo ser inibido por vários produtos solúveis originados da própria reação das enzimas, o que torna bastante difícil explicar o que efetivamente aconteceu ao longo do processo. Por exemplo, a natureza da enzima pode ser utilizada para explicar a provável inibição. De forma geral, as celulases produzidas por fungos filamentosos apresentam valores ótimos de pH na faixa ácida (3,6-5,0), enquanto que as bactérias chegam a produzir celulases altamente ativas em valores de pH alcalinos (Castro & Pereira Júnior, 2010). O fosfito de potássio apresenta uma faixa de pH 7,0 (Norrie & Keathley, 2005), valor que pode ter inibido a atividade enzimática.

2.4. Conclusões

Sobre a morfologia do fungo *C. gloeosporioides*, as concentrações do extrato da alga marinha *A. nodosum* aplicadas, nas condições em que estes ensaios foram desenvolvidos, induzem o crescimento vegetativo da espécie fúngica, favorecem a esporulação do microrganismo e reduzem a adesão e germinação dos conídios produzidos pelo fungo.

Por sua vez, as diferentes concentrações do fosfito de potássio aplicadas nos ensaios, interferem no crescimento vegetativo normal de *C. gloeosporioides*, reduzem a esporulação do microrganismo e a adesão dos propágulos infectivos da espécie fúngica.

Fisiologicamente, o extrato de *A. nodosum*, em todas as concentrações utilizadas nos ensaios aqui apresentados, interfere de modo significativo na permeabilidade seletiva da membrana plasmática da hifa do fungo *C. gloeosporioides*. Além disso, o crescimento vegetativo de estruturas do fungo em contato com o extrato, implica em maior conteúdo de proteínas no micélio, bem como, aumento da atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. O extrato de algas também interfere diminuindo a capacidade celulolítica de *C. gloeosporioides*, sendo, essa última informação, algo inédito no contexto do manejo de fitopatógenos com extrato de algas marinhas.

As concentrações 0,3% (maior dose recomendada pelo fabricante) e 0,4% do fosfito de potássio, interferem de modo significativo na permeabilidade seletiva do agente causal da antracnose em frutas tropicais. Contudo, o produto, nas concentrações e condições utilizadas nestes ensaios, não incrementa o conteúdo de proteínas no micélio fúngico, mas diminui a atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. Finalmente, o fosfito de potássio inibe a atividade celulolítica da hifa de *C. gloeosporioides*.

A partir dessas análises, pode-se concluir que tanto o extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* quanto o fosfito de potássio, ambos disponíveis comercialmente com os nomes Acadian® e Phytogard®, respectivamente, interferem de modo prejudicial sobre a morfologia e a fisiologia do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, agente de antracnose em diversos cultivos de interesse econômico para o Brasil.

REFERÊNCIAS

- Abd-Alla, M. A., Haggag, W. M. (2010). New safe methods for controlling anthracnose disease of mango (*Mangifera indica* L.) fruits caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). **Journal of American Science**, 8(8), 361-367.
- ACADIAN. (2009). **Ciência das Plantas**. Disponível em:
<<http://www.acadianagritech.ca/portuguese/PSansA.htm>>. Acesso em 06 de mai. 2017.
- Adams, D. J. (2004). Fungal cell wall chitinases and glucanases. **Microbiology**, 150, 2029-2035.
- Adaskaveg, J. E., Hartin, R. J. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. **Phytopathology**, 87(9), 979-987.
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, 93(5), 579-587.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W., Blackwell, M (1996). **Introductory Mycology**. New York: John Wiley & Sons. 869 p.
- Ambika, S., Sujatha, K. (2014). Comparative studies on brown, red and green alga seaweed extracts for their antifungal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *udum* in Pigeon pea var. CO (Rg) 7 (*Cajanus cajan* (L.) Mills.). **Journal of Biopesticides**, 7(2), 167.
- Ambika, S., Sujatha, K. (2015). Antifungal activity of aqueous and ethanol extracts of seaweeds against sugarcane red rot pathogen (*Colletotrichum falcatum*). **Scientific Research and Essays**, 10(6), 232-235.
- Amiri, A.; Bompeix, G. (2011). Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, 30(1), 222-227.
- Anderson, D. W., Nicholson, R. L. (1996). Characterization of a laccase in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**, 996-1002.
- Araújo, L., Stadnik, M. J., Borsato, L. C., Valdebenito-Sanhueza, R. M. (2008). Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, 33(2), 148-152.
- Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D., Ar Gall, E. (2010). Phenolic compounds in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*: distribution and radical-scavenging activities. **Phytochemical Analysis**, 21(5), 399-405.
- Bailey, J. A. J. A., Jeger, M. J. (1992). **Colletotrichum**: biology, pathology and control (No. 04; QK625, B35).
- Barros, J. S. G., Gomes, E. C. S., CAVALCANTI, L. S. (2015). Efeito de extratos de *Allamanda blanchetti* no controle de *Alternaria brassicicola* em mudas de couve-manteiga. **Revista Caatinga**, 28(3), 36-46.
- Bartnicki-Garcia, S. (1970). Cell wall composition and other biochemical markers in fungal phylogeny. In: Harborne, J. B. **Phytochemical Phylogeny**. London: Academic Press. p. 81-103.
- Bauermeister, A., Rezende, M. I., Giese, E. C., Dekker, R. F. H., de Melo Barbosa, A. (2010). β -(1,3)-glucanases Fúngicas: Produção e Aplicações Biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, 31(2), 75-86.
- Beguín, P. (1990). Molecular biology of cellulose degradation. **Annual Reviews in Microbiology**, 44(1), 219-248.
- Belanche, A., Ramos-Morales, E., Newbold, C. J. (2016). *In vitro* screening of natural feed additives from crustaceans, diatoms, seaweeds and plant extracts to manipulate rumen fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 96(9), 3069-3078.
- Bernstein, B., Zehr, E. I., Dean, R. A., Shabi, E. (1995). Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. **Plant Disease**, 79(5), 478-482.

- Binyamini, N., Schiffmann-Nadel, M. (1972). Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, 62(6), 592-594.
- Blum, L. E. B., Amarante, C. V. T. D., Dezanet, A., Lima, E. B. D., Hack Neto, P., Ávila, R. D., Siega, V. (2007). Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29(2), 265-268.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, 72(1-2), 248-254.
- Caixeta, A. O., Vieira, B. S., Canedo, É. J. Efeito do fosfito de potássio sobre fungos fitopatogênicos do feijoeiro. **Revista do Centro Universitário de Patos de Minas**, 2178, 7662.
- Castro, A. M. D., Pereira Jr, N. (2010). Produção, propriedades e aplicação de celulasas na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, 33(1), 181-188.
- Chen, Z., Nunes, M. A., Silva, M. C., Rodrigues Jr, C. J. (2004). Appressorium turgor pressure of *Colletotrichum kahawae* might have a role in coffee cuticle penetration. **Mycologia**, 96(6), 1199-1208.
- Coelho, A. F. S., Dias, M. S. D. C., Rodrigues, M. L. M., Leal, P. A. M. (2010). Controle pós-colheita da antracnose da banana-prata anã tratada com fungicidas e mantida sob refrigeração. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(4), 1004-1008.
- Colapietra, M., Alexander, A. (2006). Effect of foliar fertilization on yield and quality of table grapes. **Acta Horticulturae**, 721, 213-218.
- Colman, M. O. B., Quintana, C. D. P. (2016). Control de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz y Sacc en pos cosecha de frutas de mango (*Mangifera indica* L.). **Tecnología Agraria**, 1(1), 7-14.
- Coşoveanu, A. N. D. R. E. E. A., Axine, O., Iacomì, B. (2010). Antifungal activity of macroalgae extracts. **UASVM Bucharest**, 3, 442-447.
- Dalio, R. J., Fleischmann, F., Humez, M., Osswald, W. (2014). Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **PloS One**, 9(1), e87860.
- Deacon, J. W. (2005). **Fungal Biology**. 4th ed. Oxford: Blackwell Publishing. 380 p.
- Deliopoulos, T., Kettlewell, P. S., Hare, M. C. (2010). Fungal disease suppression by inorganic salts: A review. **Crop Protection**, 29(10), 1059-1075.
- Duarte, M. L. R., Albuquerque, F. C., Albuquerque P. S. B. (2005). Doenças da Pimenta do Reino. In: Kimati, H., Amorin, L., Resende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 507-516.
- Fernández-Ortuño, D., Chen, F., Schnabel, G. (2012). Resistance to pyraclostrobin and boscalid in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in the Carolinas. **Plant Disease**, 96(8), 1198-1203.
- Fitzell, R. D. (1987). Epidemiology of anthracnose disease of avocados. **South African Avocado Growers' Association Yearbook**, 10, 113-116.
- Foley, S. A., Szegezdi, E., Mulloy, B., Samali, A., Tuohy, M. G. (2011). An unfractionated fucoidan from *Ascophyllum nodosum*. Extraction, characterization, and apoptotic effects *in vitro*. **Journal of Natural Products**, 74(9), 1851-1861.
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. (2017). Disponível em <<http://www.frac.info/resistance-overview/mechanisms-of-fungicide-resistance>>. Acesso em 19 de mai. 2017.
- Freeman, S., Katan, T., Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, 82(6), 596-605.

- Garajova, S., Mathieu, Y., Beccia, M. R., Bennati-Granier, C., Biaso, F., Fanuel, M., Henrissat, B. (2016). Single-domain flavoenzymes trigger lytic polysaccharide monooxygenases for oxidative degradation of cellulose. **Scientific Reports**, 6, 28276.
- Gardner, R. M., Doerner, K. C., White, B. A. (1987). Purification and characterization of an exo- β -1,4-glucanase from *Ruminococcus flavefaciens* FD-1. **Journal of Bacteriology**, 169(10), 4581-4588.
- Giese, E. C., Barbosa, A. M., da Silva, M. D. L. C. (2003). Glucanases Fúngicas. **Novas Aplicações para a Engenharia Genética**, 30, 97.
- Gow, N. A., Brown, A. J., Odds, F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasion. **Current Opinion in Microbiology**, 5(4), 366-371.
- Guedes, C. E. S., Alvarez, R. C., Ximenes, E. A., Paulillo, L. C., Lima, S. T. C., Barbosa, L. V. (2017). Enzyme activity of cellulases produced by *Moniliophthora perniciosa*, the causing factor of “witch-broom” in cacao plants. **Magistra**, 26(4), 545-553.
- Guest, D., Grant, B. (1991). The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews**, 66(2), 159-187.
- Guzzo, S. D., Martins, E. M. F. (1996). Local and systemic induction of β -1, 3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, 144(9-10), 449-454.
- Hartill, W. F. T. (1992). **Post-harvest rots of avocados in New Zealand and their control**. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=GB9402094>>. Acesso em 13 mai. 2017.
- Haug, A., & Larsen, B. (1958). Phenolic compounds in brown algae. **Acta Chemica Scandinavica**, 12(4), 650-657.
- Hirayama, T., Horie, S., Nagayama, H., Matsuda, K. (1978). Studies on cellulases of a phytopathogenic fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara: II. Purification and properties of a β -glucosidase. **The Journal of Biochemistry**, 84(1), 27-37.
- Hornsey, I. S., Hide, D. (1976). The production of antimicrobial compounds by British marine algae II. Seasonal variation in production of antibiotics. **British Phycological Journal**, 11(1), 63-67.
- Howard, R. J. (2001). Cytology of fungal pathogens and plant—host interactions. **Current Opinion in Microbiology**, 4(4), 365-373.
- Jayaraman, J., Norrie, J., Punja, Z. K. (2011). Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 353-361.
- Jiang, Z., Okimura, T., Yokose, T., Yamasaki, Y., Yamaguchi, K., & Oda, T. (2010). Effects of sulfated fucan, ascophyllan, from the brown alga *Ascophyllum nodosum* on various cell lines: A comparative study on ascophyllan and fucoidan. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 110(1), 113-117.
- Jiménez-Escrig, A., Gomez-Ordóñez, E., Rupérez, P. (2011). 26 Seaweed as a source of novel nutraceuticals: sulfated polysaccharides and peptides. **Advances in Food and Nutrition Research**, 64(64), 325-337.
- Khan, W., Hiltz, D., Critchley, A. T., & Prithiviraj, B. (2011). Bioassay to detect *Ascophyllum nodosum* extract-induced cytokinin-like activity in *Arabidopsis thaliana*. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 409-414.
- King, M., Reeve, W., Van der Hoek, M. B., Williams, N., McComb, J., O'Brien, P. A., & Hardy, G. E. S. J. (2010). Defining the phosphite-regulated transcriptome of the plant pathogen *Phytophthora cinnamomi*. **Molecular Genetics and Genomics**, 284(6), 425-435.
- Kitajima, E.W.; Tanaka, F.A.O. (2011). **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Piracicaba: NAP/MEPA ESALQ.

- Kolattukudy, P. E., Rogers, L. M., Li, D., Hwang, C. S., & Flaishman, M. A. (1995). Surface signaling in pathogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 92(10), 4080-4087.
- Kombrink, E., Hahlbrock, K. (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. **Plant Physiology**, 81(1), 216-221.
- Kracher, D., Scheiblbrandner, S., Felice, A. K., Breslmayr, E., Preims, M., Ludwicka, K., Ludwig, R. (2016). Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation. **Science**, 352(6289), 1098-1101.
- Kurozawa, C., Pavan, M. A. (2005). Doenças do Tomateiro. In: Kimati, H., Amorin, L., Resende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 607-626.
- Kurozawa, C., Pavan, M. A., Rezende, J. A. M. (2005). Doenças das Curcubitáceas. In: Kimati, H., Amorin, L., Resende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 293-302.
- Leadbeater, A. (2012). 12 Resistance Risk to QoI Fungicides and Anti-Resistance Strategies. **Fungicide resistance in crop protection: Risk and Management**, 141.
- Leal, T. T. B., de Oliveira, F. É. R., de Oliveira, V. C., Gonzalez, S. D. P., da Silva, R. M., dos Reis, A. S., da Silva, F. (2017). Extrato de pimenta dioica no controle *in vitro* de *Aspergillus niger*, patógeno da cultura do sisal. **Magistra**, 28(2), 254-260.
- Lever, M. (1972). A new reaction for colorimetric determination of carbohydrates. **Analytical Biochemistry**, 47(1), 273-279.
- Lima, N. B., Lima, W. G., Tovar-Pedraza, J. M., Michereff, S. J., Câmara, M. P. (2015). Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. **European Journal of Plant Pathology**, 141(4), 679-688.
- Limberger, P. A., Gheller, J. A. (2012). Efeito da aplicação foliar de extrato de algas, aminoácidos e nutrientes via foliar na produtividade e qualidade de alface crespa. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, 1, 148-161.
- Lins, S. R. O., Oliveira, S. M. A., Alexandre, E. R., Maria, A., Santos, G., Oliveira, T. A. S. (2011). Controle alternativo da podridão peduncular em manga. **Summa Phytopathologica**, 37(3), 121-126.
- Liu A., Chen, W., Li, X. (2005). Changes in the postharvest physiology and lychee fruits latently infected by anthracnose fungus and the biological characteristic of the pathogenic fungus of the disease. **Acta Horticulturae**, 665, 365-371.
- Liu, Z. M., & Kolattukudy, P. E. (1998). Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as an ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation. **Journal of Bacteriology**, 180(14), 3592-3597.
- Ljungdahl, L. G., & Eriksson, K. E. (1985). Ecology of microbial cellulose degradation. In: **Advances in microbial ecology**. New York: Springer US. p. 237-299.
- Lopes, L. F. (2008). **Efeitos de aplicações pós-colheita de fosfitos, ácido acetilsalicílico e 1-metilciclopropeno sobre a antracnose do mamoeiro**. 2008. 82 p. Mestrado em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- Malusa, E., Tosi, L. (2005). Phosphorous acid residues in apples after foliar fertilization: results of field trials. **Food Additives and Contaminants**, 22(6), 541-548.
- Marx, D.H. (1969). The influence of ectotrophic mycorrhizal fungi on the resistance of pine roots to pathogenic infections: I. Antagonism of mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Phytopathology**, 59, 153-163.

- Marzluf, G. A. (1997). Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, 61(1), 17-32.
- Mattner, S. W., Villalta, O. N., Wite, D., Porter, I. J., Arioli, T. (2014). *In vitro* suppression of *Sclerotinia minor* by a seaweed extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. **Australasian Plant Disease Notes**, 9(1), 137.
- McDonald, A. E., Grant, B. R., Plaxton, W. C. (2001). Phosphite (phosphorous acid): its relevance in the environment and agriculture and influence on plant phosphate starvation response. **Journal of Plant Nutrition**, 24(10), 1505-1519.
- Medeiros, J. P. Q., De Pinho, R. S. C., Machado, J. D. U. F., Arns, R. B. (2017). Fosfíto de potássio na incidência de fungos e na germinação de sementes de soja. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, 8(2).
- Melo, L. G. L., Candido, E. K., Neto, J. R. M. C., Lins, S. R. O., Rodrigues, A. A. C., Oliveira, S. M. A. (2016). Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51(10), 1703-1709.
- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant infection and the establishment of fungal biotrophy. **Trends in Plant Science**, 7(8), 352-356.
- Mendgen, K., Hahn, M., Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, 34(1), 367-386.
- Mercure, E. W., Leite, B., Nicholson, R. L. (1994a). Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 45(6), 421-440.
- Mercure, E. W., Kunoh, H., Nicholson, R. L. (1994b). Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves, a requirement for disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 45(6), 407-420.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U.M., Flott, B.E., Reisener, H.J. (1988). Lignin biosynthetic enzymes in stem rust infected resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, 33, 33-46.
- Moreira, L. M., May-De, L. L. M., Valdebenito-Sanhueza, R. M., Lima, M. L. R. Z. C., Possamai, J. C. (2002). Controle em pós-colheita de *Monilinia fruticola* em pêssegos. **Fitopatologia Brasileira**, 27(4), 395-398.
- Nicholson, R. L. (1992). *Colletotrichum graminicola* and the anthracnose diseases of maize and sorghum. In: Bailay, J. A., Jeger, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International. p. 186-202.
- Nicholson, R. L., Epstein, L. (1991). Adhesion of fungi to the plant surface. In: **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Springer US. p. 3-23.
- Norrie, J., Keathley, J. P. (2005). Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to Thompson Seedless grape production. In: **X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production**, 727. p. 243-248.
- Noronha, E. F., Ulhoa, C. J. (2000). Characterization of a 29-kDa β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum*. **FEMS Microbiology Letters**, 183(1), 119-123.
- O'Connell, R. J., Pain, N. A., Hutchison, K. A., Jones, G. L., Green, J. R. (1996). Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microscopy**, 181(2), 204-212.
- Odds, F. C., Brown, A. J., & Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, 11(6), 272-279.

- Oliari, I. C. R., Barcelos, R. A., Fedrigo, K., Garcia, C., Marchi, T., Botelho, R. V. (2014). Extrato de alga no controle *in vitro* de *Monilinia fructicola*. **Cadernos de Agroecologia**, 9(1).
- Oliver, R. P., & Hewitt, H. G. (2014). **Fungicides in crop protection**. Wallingford: CABI.
- Pain, N. A., Green, J. R., Jones, G. L., O'Connell, R. J. (1996). Composition and organisation of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Protoplasma**, 190(3), 119-130.
- Pascholati, S. F. (2011). Fisiologia do parasitismo: como os patógenos atacam as plantas. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A. **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres. p. 543-592.
- Peres, J. C. F., Carvalho, L. R. D., González, E., Berian, L. O. S., Felicio, J. D. (2012). Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, 36(3), 294-299.
- Perfect, S. E., Hughes, H. B., O'Connell, R. J., Green, J. R. (1999). *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, 27(2-3), 186-198.
- Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E. H., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, 44(1), 33-43.
- Podila, G. K., Rogers, L. M., Kolattukudy, P. E. (1993). Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Physiology**, 103(1), 267-272.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, 34(1), 413-434.
- Raduan, J. L. F. P. R. (2017). **Métodos de controle de *Colletotrichum* spp. em *Acca sellowiana* (Berg) Burret: avaliação *in vitro* e em fragmentos de frutos pós-colheita**. 2017. 34p. Monografia, Agronomia, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil.
- Rana, D. S., Thèodore, K., Naidu, G. S. N., & Panda, T. (2003). Stability and kinetics of β -1, 3-glucanase from *Trichoderma barzianum*. **Process Biochemistry**, 39(2), 149-155.
- Reuveni, M., Sheglov, D., Cohen, Y. (2003). Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**, 87(8), 933-936.
- Reyes, P., Pickard, M. A., & Vazquez-Duhalt, R. (1999). Hydroxybenzotriazole increases the range of textile dyes decolorized by immobilized laccase. **Biotechnology Letters**, 21(10), 875-880.
- Ribeiro Júnior, P. M., Resende, M. L. V., Pereira, R. B., Cavalcanti, F. R., Amaral, D. R., Pádua, M. A. (2006). Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 30(4), 629-636.
- Ribeiro, J. G., Serra, I. M. R. S., Araújo, M. U. P. (2016). Use of natural products to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. **Summa Phytopathologica**, 42(2), 160-164.
- Roma, R. C. C. (2013). **Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva Itália e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer***. 2013. 117p. Doutorado em Fitopatologia, ESALQ, Piracicaba, Brasil.
- Ryu, D. D., Mandels, M. (1980). Cellulases: biosynthesis and applications. **Enzyme and Microbial Technology**, 2(2), 91-102.
- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Grade, A. C. (2003). Atividade celulolítica *in vitro* de *Cylindrocadium clavatum* e o efeito de filtrados de cultivo do fitopatógeno sobre plântulas de eucalipto. **Acta Scientiarum: Agronomy**, 25(1), 155-160.

- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Pascholati, S. F. (2008), Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S. F., Leite, B., Stangarlin, J. R., Cia, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ. p. 227-248.
- Sela-Buurlage, M. B., Epstein, L., Rodriguez, R. J. (1991). Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 39(5), 345-352.
- Shabi, E., Katan, T. A. L. M. A. (1983). Occurrence and control of anthracnose of almond in Israel. **Plant Disease**, 67, 1364-1366.
- Shih, J., Wei, Y., Goodwin, P. H. (2000). A comparison of the pectate lyase genes, Pel-1 and Pel-2, of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. **Gene**, 243(1), 139-150.
- Sieburth, J. M. (1964). Antibacterial substances produced by marine algae. **Developments in Industrial Microbiology**, 5, 124-134.
- Stadnik, M. J., Freitas, M. B. Polissacarídeos algais: fonte de indutores de resistência de plantas. In: Rodrigues, F. A., Fortunato, A. A., Resende, R. S. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2012. p. 29-50.
- Subramanian, S., Sangha, J. S., Gray, B. A., Singh, R. P., Hiltz, D., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. (2011). Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, 131(2), 237-248.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2012). **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers. 690 p.
- Taylor, E. E., Marsh, P. B. (1963). Cellulose decomposition by *Pythium*. **Canadian Journal of Microbiology**, 9(3), 353-358.
- Teeri, T. T. (1997). Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. **Trends in Biotechnology**, 15(5), 160-167.
- Terao, D., Batista, D.C., Ribeiro, I. J. A. (2016). Doenças da Mangueira. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. vol. 2. São Paulo: Agrômica Ceres. p. 523-534.
- Toledo, G. L., Ovalle, I. I. (2008). **Estatística Básica**. 2. ed. São Paulo: Atlas. 459 p.
- Tucker, S. L., Talbot, N. J. (2001). Surface attachment and pre-penetration stage development by plant pathogenic fungi. **Annual Review of Phytopathology**, 39(1), 385-417.
- Ugarte, R. A., Sharp, G., Moore, B. (2006). **Changes in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. plant morphology and biomass produced by cutter rake harvests in southern New Brunswick, Canada**. In: Eighteenth International Seaweed Symposium. Springer, Netherlands. p. 125-133.
- Van Vu, B., Itoh, K., Nguyen, Q. B., Tosa, Y., Nakayashiki, H. (2012). Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25(9), 1135-1141.
- Vázquez-Garcidueñas, S., Leal-Morales, C. A., & Herrera-Estrella, A. (1998). Analysis of the β -1,3-glucanolytic system of the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64(4), 1442-1446.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Marine Drugs**, 9(12), 2514-2525.

- Viana, F., Oliveira, E. S., Gomes Pessoa, M. N., Martins, M. (2012). **Inibição *in vitro* de *Colletotrichum musae*, agente da antracnose da banana, por meio de agentes vegetais, biológicos e químicos.** Embrapa Agroindústria Tropical-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E). Boletim Técnico 57.
- Walton, J. D. (1994). Deconstructing the cell wall. **Plant Physiology**, 104(4), 1113.
- Wang, Y., Xu, Z., Bach, S. J., McAllister, T. A. (2008). Effects of phlorotannins from *Ascophyllum nodosum* (brown seaweed) on *in vitro* ruminal digestion of mixed forage or barley grain. **Animal Feed Science and Technology**, 145(1), 375-395.
- Wood, T. M. (1985). Properties of cellulolytic enzyme systems. **Biochemical Society Transactions**, 13(2), 407-410.
- Wu, Y., Jenkins, T., Blunden, G., von Mende, N., Hankins, S. D. (1998). Suppression of fecundity of the root-knot nematode, *Meloidogyne javanica*, in monoxenic cultures of *Arabidopsis thaliana* treated with an alkaline extract of *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, 10(1), 91-94.
- Young, D. H., & Kauss, H. (1984). Adhesion of *Colletotrichum lindemuthianum* spores to *Phaseolus vulgaris* hypocotyls and to polystyrene. **Applied and environmental microbiology**, 47(4), 616-619.
- Zambolim, L., Vale, F. X. R., Zambolim, E. M. (2005). Doenças do Cafeeiro. In: Kimati, H., Amorin, L., Resende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas.** São Paulo: Agronômica Ceres. p. 165-180.
- Zheng, M., Shi, J., Shi, J., Wang, Q., Li, Y. (2013). Antimicrobial effects of volatiles produced by two antagonistic *Bacillus strains* on the anthracnose pathogen in postharvest mangos. **Biological Control**, 65(2), 200-206.
- Zulfiqar, M., Brlansky, R. H., Timmer, L. W. (1996). Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides*. **Mycologia**, 121-128.

3. POTENCIAL DA INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA MEDIADA PELO EXTRATO DA ALGA MARINHA *Ascophyllum nodosum* E PELO FOSFITO DE POTÁSSIO, APLICADA AO MANEJO DA ANTRACNOSE EM FRUTOS DE MANGA ‘TOMMY ATKINS’

Resumo

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas frescas e existem espécies frutíferas espalhadas por todo o território nacional. Do montante de frutas frescas produzidas no país, pouco mais de 1,0% é destinado ao mercado internacional e, nessa fase da cadeia produtiva, as perdas giram em torno de 30 a 40%. A manga aparece em quinto lugar com perdas de até 28% do total produzido e estas ocorrem por danos mecânicos, distúrbios fisiológicos e/ou ocorrência de podridões, como as causadas pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, patógeno mais importante na pós-colheita desses frutos. Quando permitido, a utilização de fungicidas ainda é a principal medida de controle de podridões na pós-colheita. Entretanto, a preocupação mundial com relação à poluição ambiental e aos riscos à saúde promovidos pelos agrotóxicos, somado à resistência de patógenos à fungicidas e a retirada de alguns produtos do mercado, têm levado ao aumento de pesquisas envolvendo a utilização de agentes alternativos, potenciais indutores de resistência, para o controle de doenças na pós-colheita. Nesse contexto, produtos como os extratos de algas marinhas, a exemplo do extrato da alga *Ascophyllum nodosum*, e os fosfitos de potássio, despontam como alternativas promissoras. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* (Acadian®) e do fosfito de potássio (Phytogard®), ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre o parasitismo do fungo *C. gloeosporioides* em mangas ‘Tommy Atkins’, na perspectiva da indução de resistência, na fase de pós-colheita desses frutos. Foram testadas 4 concentrações, de modo independente, para cada produto, sendo: 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0%, para o extrato de algas e 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%, para o fosfito de potássio. Nos dois casos foram utilizados três controles, sendo: 150 µg de Amistar® (estrobilurina) L⁻¹, 50 mg de Bion® (acibenzolar-S-metílico – ASM) L⁻¹ e um controle sem nenhum tipo de produto (controle negativo). Os ensaios foram desenvolvidos sob duas perspectivas, sendo: (1) avaliação da severidade da doença nos frutos tratados, determinada pelo diâmetro da lesão 12 dias após a inoculação do fungo, velocidade de crescimento da lesão e determinação da área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD); (2) resposta de defesa induzida nos frutos, determinada pela verificação do conteúdo total de proteínas nas amostras, atividades das enzimas β-1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, superóxido-dismutase, catalase, polifenoloxidase, fenilalanina amônia-liase e conteúdo total de fenóis. Os resultados demonstraram que, tanto para o extrato de algas quanto para o fosfito de potássio, houve diminuição do diâmetro da lesão, da velocidade de crescimento da lesão e da AACPD. Além disso, foram observados incrementos em todos os parâmetros bioquímicos analisados. Assim, tanto o Acadian® quanto o Phytogard® exibem potencial na indução da resistência de mangas contra a antracnose e configuram como alternativas de manejo para a antracnose, na fase de pós-colheita dessas frutas.

Palavras-chave: RSA; Proteínas-RP; Pós-colheita

Abstract

Brazil is the third largest producer of fresh fruit in the world and there are fruit species spread all over the country. Of the amount of fresh fruit produced in the country, slightly more than 1.0% is destined to the international market and, at this stage of the production chain, the losses can reach 30 to 40%. Mango appears in fifth place with losses of up to 28% of the total produced and these occur due to mechanical damages, physiological disorders and/or occurrence of rot, such as those caused by the fungus *Colletotrichum gloeosporioides*, the most important pathogen in the post-harvest of these fruits. When allowed, the use of fungicides is still the main control measure applied to post-harvest rot. However, worldwide concern regarding environmental pollution and health risks promoted by pesticides, together with the pathogen resistance to fungicides and the withdrawal of some products from the market, have led to the increase of research involving the use of alternative agents, as potential resistance inducers to control post-harvest diseases. In this context, products such as *Ascophyllum nodosum* seaweed extract and potassium phosphites appear as promising alternatives. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of *A. nodosum* seaweed extract (Acadian®) and of the potassium phosphite (Phytogard®), both applied in different concentrations, on the parasitism of the fungus *C. gloeosporioides* in 'Tommy Atkins' mangoes, from the perspective of induction of resistance in the post-harvest phase of these fruits. Four concentrations were tested independently for each product, being: 0.1%, 0.3%, 0.5% and 1.0%, for algae extract and 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4% for potassium phosphite. In both cases, three controls were used: 150 µg Amistar® (strobilurin) L⁻¹, 50 mg Bion® (acibenzolar-S-methyl- ASM) L⁻¹ and one control without

any type of product (negative control). The tests were carried out in two stages: (1) Evaluation of the severity of the disease in the treated fruits, determined by the lesion diameter 12 days after inoculation of the fungus, growth rate of the lesion and determination of the area under the disease progress curve (AUDPC); (2) Induced defense response in fruits, determined by the verification of the total protein content in the samples, activities of the enzymes β -1,3-glucanase, chitinase, peroxidase, superoxide dismutase, catalase, polyphenoloxidase, phenylalanine ammonia-lyase and total content of phenols. The results showed that, for both algae extract and potassium phosphite, there was a decrease in lesion diameter, lesion growth rate and AUDPC. In addition, increases were observed in all biochemical parameters analyzed. Thus, both Acadian® and Phytogard® have the potential to induce anthracnose mango resistance and may be used as management alternative for anthracnose in the post-harvest phase of these fruits.

Palavras-chave: SAR; PR-proteins; Postharvest

3.1. Introdução

Centenas de espécies de frutas estão espalhadas nos estados brasileiros, que juntos formam um território de extensão continental. Dezenas de polos, em regiões de cultivo com peculiaridades de clima e solo com vocações distintas, abastecem o mercado nacional e ainda se inserem no concorrido comércio internacional. O Brasil, definitivamente, é um país favorável para o desenvolvimento da fruticultura. Nos trópicos e nas zonas temperadas são colhidos quase todos os tipos de frutas existentes no planeta, e só isso já dá a dimensão do quanto essa terra, das micro às pequenas, médias e grandes propriedades, é identificada com os pomares.

O Brasil, terceiro maior produtor mundial de frutas frescas, tem pleno potencial para aumentar a produção atual, de cerca de 43 milhões de toneladas/ano, caso seja demandado. As espécies frutíferas espalhadas pelo território nacional somam em torno de 500 variedades, das quais, 220 são só de plantas nativas da Amazônia Legal (Treichel et al., 2016). Favorecido pela extensão territorial, pela posição geográfica, pelo solo e pelas condições climáticas, o país produz frutas tropicais, subtropicais e temperadas. Até o ano de 2014, 22 fruteiras eram recenseadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015). O estado de São Paulo se destaca como o maior produtor nacional de frutas frescas, sendo responsável por pouco mais de 15 milhões de toneladas do total produzido, seguido pelos estados da Bahia, Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Paraná, os quais, somados, têm produção média de 10 milhões de toneladas/ano (IBGE, 2015).

O ano de 2015 foi marcado pelo aumento do número de exportações de frutas frescas no Brasil. Em relação ao ano de 2014, segundo dados levantados pela Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária – CNA, houve um aumento médio de 11,44% em volume e 3,8% em receita (CNA, 2016). Dos cinco estados com maior volume de exportação de frutas frescas no país, três estão localizados na região nordeste, sendo eles o Ceará, a Bahia e o estado do Pernambuco. Dos frutos com maior volume de exportação, o melão aparece em primeiro lugar, seguido pela manga, ocupando o segundo lugar, tanto no ano de 2013 quanto no ano de 2014 (Reetz et al., 2015).

Do montante de frutas frescas produzidas no país, pouco mais de 1,0% é destinado ao mercado internacional e, nessa fase da cadeia produtiva, as perdas giram em torno de 30 a 40% (Reetz et al., 2015). Em pesquisa feita por Lima et al. (2010) é possível verificar os índices de perdas das principais frutas produzidas no país. A manga aparece em quinto lugar com perdas de até 28% do total produzido. Tais perdas ocorrem por danos mecânicos, distúrbios fisiológicos e/ou ocorrência de podridões (Benato et al., 2001).

Quando permitido, a utilização de fungicidas ainda é a principal medida de controle de podridões na pós-colheita. Entretanto, a preocupação mundial com relação à poluição ambiental e aos riscos à saúde promovidos pelos agrotóxicos, somado à resistência de patógenos à fungicidas e a retirada de alguns produtos do mercado, têm levado

ao aumento de pesquisas envolvendo a utilização de agentes alternativos, potenciais indutores de resistência, para o controle de doenças na pós-colheita (Cia et al., 2007).

Durante o desenvolvimento dos frutos e após a sua colheita, a resistência natural a doenças geralmente declina, direcionando o vegetal aos inevitáveis processos de infecção, doença e morte. As doenças pós-colheita causadas por fungos, são provenientes de infecções quiescentes estabelecidas no campo, ou de infecções por ferimentos, que podem ocorrer durante subsequente colheita e manuseio (Hojo et al., 2007; Souza et al., 2011). O declínio da resistência natural dos frutos pode ativar infecções quiescentes e aumentar a severidade ou incidência de doenças (Terry & Joyce, 2004). De acordo com Prusky (1996) e Cia et al. (2007), quatro são os fatores que afetam o declínio da resistência natural dos frutos após a colheita: (1) necessidades nutricionais do patógeno; (2) compostos antifúngicos pré-formados; (3) compostos antifúngicos pós-formados (fitoalexinas e proteínas relacionadas com a patogênese [proteínas-RP]); e (4) ativação de fatores fúngicos de patogenicidade. Os fatores 1 e 4, tendem a aumentar com o amadurecimento e consequente senescência do fruto, enquanto que os fatores 2 e 3 tendem a ser suprimidos. Tal fato é evidenciado no trabalho de Pinho et al. (2010), no qual os autores, avaliando diferentes genótipos de bananeira resistentes à sigatoka negra, verificaram menor incidência do fungo *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx. na cultivar Thap Maeo após 12 dias de inoculação. Segundo os autores, isso se deu pelo lento processo de amadurecimento do fruto, quando comparado às outras cultivares avaliadas. No trabalho de Afek et al. (1999), os autores observaram o acúmulo de umbeliferona em pomelos maduros e imaturos em proporções que variaram entre 28 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 250 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente, quatro dias após a inoculação com o fungo *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc, sugerindo que a umbeliferona participa dos processos de defesa de pomelos imaturos contra o fungo.

Em mangas, um dos principais fatores limitantes à produção é a ocorrência da antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., uma das doenças mais importantes na redução da qualidade desses frutos (Chitarra, 1990; Ploetz, 1994; Barbosa et al., 2000; Sales Júnior et al., 2004). Todos os órgãos da planta são atacados pelo patógeno: flores, panículas, ramos, folhas e frutos (Ploetz, 1994), sendo este último, afetado em qualquer estágio de desenvolvimento. A infecção caracteriza-se pela presença de manchas de coloração escura que, ao se coalescerem, aumentam de tamanho, tornando o fruto totalmente imprestável para a comercialização, principalmente, quando se trata de mercado internacional. A disseminação dos conídios do patógeno acontece pelo vento e, especialmente, por respingos de chuva, estando a doença altamente correlacionada com a ocorrência de longos períodos de molhamento foliar (Sales Júnior et al., 2004). Segundo Barbosa et al. (2000), períodos chuvosos e nublados, como também orvalhos intensos durante o período noturno, favorecem bastante o desenvolvimento do fungo. Em condições de elevada umidade relativa (superior a 90%) e temperaturas superiores a 22 °C, é possível observar nos frutos, nos centros das lesões formadas, pontuações pardo-amareladas que são resultantes da frutificação do patógeno (Kader, 1992; Ploetz, 1994; Barbosa et al., 2000; Terao et al., 2001).

Tradicionalmente, o controle químico tem sido aplicado no tratamento pós-colheita de frutos da mangueira com excelentes resultados. Dentre os produtos utilizados estão os cúpricos, à base de mancozebe e triazóis, tiofanato metílico a 0,05%, tebuconazole a 0,25% e o benomil a 0,03% (Terao et al., 2016), além da azoxistrobina (75 mL L⁻¹) acrescida de 0,5% de óleo mineral parafínico (Sales Júnior, 2004). Contudo, há forte pressão por parte dos consumidores, elo final e de grande importância dessa cadeia agrícola, por uma produção que atente para a proteção ambiental e segurança alimentar, esta última, focada em alimentos cada vez mais livres de resíduos químicos. Nesse contexto, a indução de resistência desponta como uma alternativa promissora.

Vários indutores bióticos ou abióticos podem ativar os mecanismos de defesa das plantas, processo entendido como 'indução de resistência' (Pieterse et al., 2012; Walters et al., 2013; Pieterse et al., 2014; Romanazzi et

al., 2016). Esses produtos geram nos vegetais um rápido e expressivo número de respostas contra o ataque de microrganismos (Luna et al., 2012; Fu & Dong, 2013). Assim, pode-se definir a indução de resistência como as respostas eliciadas em um vegetal após a exposição deste a um agente indutor (Romanazzi et al., 2016). Em pós-colheita, muitos mecanismos de defesa induzidos ou pós-formados estão envolvidos na resistência natural dos frutos (Barkay-Golan, 2001). Nesse sentido, o aumento da proteção de tecidos da planta hospedeira durante os períodos de suscetibilidade através da resistência induzida ou adquirida é considerada uma estratégia preferencial para os programas de manejo integrado (Cia et al., 2007; Pascholati & Souza, 2017). A resistência induzida, também denominada de indução de proteção, imunidade adquirida ou resistência sistêmica adquirida, envolve a ativação de mecanismos latentes de resistência de uma planta (Hammerschmidt & Dann, 1999).

Os frutos possuem mecanismos estruturais e bioquímicos de defesa que podem contribuir para a resistência destes contra patógenos. Esses processos envolvem a ativação de mecanismos latentes de resistência através do uso dos mais diversos eliciadores (Liu et al., 2005; Alkan et al., 2012). Os aspectos interessantes da indução de resistência são a ausência de especificidade, refletida pelos diferentes indutores possíveis de uso e pelo amplo espectro de fitopatógenos contra os quais o fruto é protegido. Além disso, a proteção é local ou sistêmica, nesse último caso, podendo ocorrer à distância do sítio de aplicação do indutor e inoculação do patógeno (Cia et al., 2007). Dentre os indutores abióticos de resistência, as algas marinhas e os fosfitos merecem destaque.

As algas são organismos muito diversificados e de ocorrência frequente em ambientes marinhos, geralmente, apresentando rápido crescimento e produção de biomassa. Esses atributos tornam a sua exploração comercial altamente atrativa para os mais variados fins, entre eles, o uso na agricultura (Stadnik & Paulert, 2008). Sabe-se que, aproximadamente, 70% da biosfera são ocupados por biomas marinhos, os quais detêm uma grande diversidade taxonômica e, principalmente, bioquímica. Nesse contexto, as macroalgas demonstram alto potencial na geração de novas tecnologias agrícolas, sendo que, alguns produtos delas derivados, já vêm sendo comercializados para esse fim (Kulik, 1995; Stadnik & Paulert, 2008; Craigie, 2011; Pascholati et al., 2014). Assim, além do uso tradicional consagrado como fertilizantes orgânicos, as algas apresentam potencial como agentes eliciadores das defesas vegetais e também, como matéria prima na obtenção de compostos também com potencial estimulante ou fitoprotetor (Stadnik & Freitas, 2012; Pascholati et al., 2014).

Produtos à base de algas marinhas possuem na sua composição, substâncias bioativas, potencializadoras do metabolismo das plantas quando aplicados em pequenas quantidades (Stevens & Purton, 1997). Entre essas substâncias, encontram-se nutrientes essenciais, vários compostos orgânicos, enzimas, ácidos húmicos e aminoácidos, a exemplo das betaínas, além de vitaminas, hormônios vegetais e elementos inorgânicos em baixas concentrações (Khan et al., 2009; Zodape et al., 2011; Shu et al., 2013). Com foco no hospedeiro, os estudos destacam diferentes efeitos dos extratos algais sobre os vegetais, sendo, os mais recorrentes, o aumento do desenvolvimento do sistema radicular (facilitando a absorção de água e nutrientes); o aumento do crescimento vegetativo e aumento da taxa de floração e frutificação; aumento da resistência a estresses abióticos (temperaturas extremas, secas, salinidade) e estresses bióticos (resistência a pragas e doenças), o que resulta, de um modo geral, no aumento no rendimento das culturas (Crouch & van Staden, 1992; Khan et al., 2009; Zodape et al., 2011; Dantas et al., 2012; Silva et al., 2014). Uma das algas marinhas mais exploradas nesse contexto é a espécie *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Joly.

A. nodosum, uma macroalga marinha de coloração parda, pertence à família Fucaceae e é a única espécie do gênero *Ascophyllum*. É originária da porção norte do Atlântico, especialmente na região do Canadá e Noroeste europeu (Taylor, 1957; Ugarte et al., 2006; Subramanian et al., 2011). Atualmente, a alga se destaca como uma das mais utilizadas em extratos comerciais e suspensões preparadas para o uso agrícola (Zodape et al., 2011; Abubakar et al., 2013).

Anualmente, mais de 15 milhões de toneladas de produtos à base de algas marinhas são fabricados, dos quais, boa parte são considerados e utilizados como bioestimulantes, fontes suplementares de nutrientes e biofertilizantes para o aumento do crescimento das plantas e da produtividade (Khan et al., 2009).

Alguns estudos apontam para o potencial que os extratos de *A. nodosum* apresentam, na proteção direta ou indireta dos vegetais contra estresses bióticos. Featonby-Smith et al. (1983) constataram que o extrato aumenta a resistência de tomateiros a nematoides. Em outro estudo, a aplicação foliar de *A. nodosum* resultou em diminuição expressiva da severidade de míldio em videiras e da incidência de *Phytophthora capsici* em pimenteiras (Lizzi et al., 1998). A aplicação do extrato, na forma de rega no solo, em áreas produtoras de repolho, estimulou a multiplicação de microrganismos antagonistas ao oomiceto *Pythium ultimum*. Esse aumento na população do antagonista inibiu o crescimento do inóculo do patógeno, resultando na diminuição da doença (Dixon & Walsh, 2002). Jayaraman et al. (2011) demonstraram que a aplicação do extrato comercial de *A. nodosum* reduziu a incidência de doenças fúngicas, em pepinos, em condições de casa de vegetação.

Por sua vez, os fosfitos são compostos originados da neutralização do ácido fosforoso (H_3PO_3), por uma base que, sendo esta, o hidróxido de potássio, forma o fosfito de potássio (Reuveni et al., 2003). Esses produtos estão sendo comercializados como fertilizantes, entretanto, apresentam ação direta sobre o vegetal, controlando várias doenças (Guest & Grant, 1991; Ribeiro Júnior et al., 2006; Nascimento et al., 2008; Alexandre et al., 2014; Dalio et al., 2014). O controle proporcionado pelos fosfitos em plantas parece estar relacionado com o acúmulo de fitoalexinas por parte do vegetal tratado e proteínas-RP (Nascimento et al., 2008).

No âmbito da indução de resistência, o fosfito de potássio tem sido amplamente utilizado. Até o momento, não se tem um modo de ação definido para a molécula (FRAC, 2017), contudo, o trabalho de Spolti et al. (2015) verificou o modo de ação do fosfito de potássio no controle da podridão olho de boi em maçã, doença da fase de pós-colheita mais importante dessa fruta. Os autores observaram que o fosfito foi eficiente em reduzir em até 60% os danos causados pela podridão olho de boi nas maçãs tratadas sem, contudo, alterar o perfil de proteínas-PR como a peroxidase e a fenilalanina amônia-liase. Na análise realizada por Melo et al. (2016), o fosfito de potássio aplicado no campo, antes da colheita do abacaxi, reduziu em 91,67% a incidência da fusariose do abacaxizeiro e aumentou a atividade da enzima β -1,3-glucanase. Ribeiro Júnior et al. (2006) demonstrou que o fosfito pode agir na indução de mecanismos estruturais de resistência pós-formados, uma vez que furtos de cacaueiro, após tratamento com 1,25 mL L⁻¹ de fosfito de potássio, apresentaram maiores teores de lignina que frutos não tratados.

A indução de resistência se sustenta na ideia de que o vegetal, após tratamento com um agente indutor, responde de modo mais rápido e intenso ao ataque do patógeno. Essa resposta, muitas vezes, está relacionada com o aumento da atividade das enzimas de defesa produzidas pelo fruto. Assim, proteínas produzidas em maior grau no momento da infecção, em um vegetal que responde mais rápido ao ataque do patógeno, são, muitas vezes, determinantes ao estabelecimento ou não das relações parasitárias estáveis. Algumas dessas moléculas já estão presentes no hospedeiro, em níveis baixos, antes mesmo da infecção (pré-formadas). Outras, só são produzidas após o contato entre patógeno e hospedeiro (pós-formadas). De modo genérico, essas moléculas são chamadas de proteínas relacionadas com a patogênese ou proteínas-RP.

As β -1,3-glucanases são endoglucanases de massa molecular que varia entre 25 e 35 kDa e que produzem oligômeros com duas a seis unidades de glicose a partir do substrato laminarina (uma β -1,3-glucana). A β -1,3-glucana é um importante componente da parede celular de muitos fungos e essa enzima faz parte dos mecanismos bioquímicos pré e pós-formados de resistência das plantas aos fitopatógenos (Bol et al., 1990). São moléculas que estão envolvidas em vários processos fisiológicos e de desenvolvimento, como divisão celular e germinação de pólen (Doblin et al.,

2001), desenvolvimento e germinação de sementes (Leubner-Metzger et al., 1995; Buchner et al., 2002), florescimento, maturação e abscisão de frutos (Wu & Bradford, 2003) e ataque de fitopatógenos. Nesse sentido, estudos conduzidos com diferentes genótipos de trigo mostraram que a resistência do cultivar RL6082/Lr35 a *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* ocorria em função de altos níveis de β -1,3-endoglucanases constitutivas (Anguelova-Merhar et al., 1999). O trabalho realizado por Cavalcanti et al. (2006) demonstra o efeito de eliciadores biológicos e químicos no tratamento de tomateiros contra a mancha bacteriana. Os autores verificaram maior atividade da β -1,3-glucanase em plantas tratadas com os diferentes produtos, quando comparadas ao tratamento controle.

As quitinases são enzimas semelhantes às glucanases, caracterizadas por serem monômeros com massa molecular entre 25 e 35 kDa, e também são moléculas que fazem parte dos mecanismos bioquímicos pré e pós-formados de resistência das plantas contra os fitopatógenos (Bol et al., 1990). As quitinases de plantas caracterizadas são endoquitinases que produzem quitoooligossacarídeos com 2 a 6 unidades de N-acetilglucosamina (Schwan-Strada et al., 2008). Algumas dessas endoquitinases possuem atividade de lisozima, podendo hidrolisar ligações β -1,4 entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina no peptídeo bacteriano. Certas quitinases podem agir como quitosanases, além do fato de existirem também quitosanases específicas induzidas em plantas em resposta a fitopatógenos (Schwan-Estrada et al., 2008). Essas moléculas hidrolisam eficientemente a quitina, presente no citoesqueleto da hifa fúngica (Ponstein et al., 1994). Na fisiologia das plantas, essas enzimas estão envolvidas na nodulação em raízes, senescência, embriogênese, florescimento, germinação de sementes e amadurecimento de frutos (Margis-Pinheiro et al., 1994; Hamel et al., 1997; Robinson et al., 1997; Lers et al., 1998; Helleboid et al., 2000; Santos et al., 2008). Experimentos envolvendo plantas que superexpressam quitinases mostraram que folhas de cacauieiro e plantas de fumo transgênicas eram mais resistentes a *Colletotrichum gloeosporioides* e *Ralstonia solanacearum*, respectivamente, do que linhagens selvagens (Dana et al., 2006; Maxinova et al., 2006).

A enzima peroxidase (POX), presente nos tecidos das plantas, em certas células de animais e em microrganismos, é conhecida por participar de vários processos fisiológicos de importância (Hoagland, 1990). Ela catalisa a oxidação e a eventual polimerização do álcool hidroxicinâmico em presença de peróxido de hidrogênio, originando lignina. As peroxidases participam da biossíntese do hormônio vegetal etileno (Isighe et al., 1993), da oxidação de compostos fenólicos, os quais se acumulam em resposta à infecção (Fry, 1986), da oxidação do ácido indolil-3-acético (AIA) (Hoagland, 1990) e na biossíntese de lignina (Abeles & Biles, 1991; Intapruk et al., 1994). Mudanças na atividade das peroxidases têm sido frequentemente correlacionadas à resposta de resistência ou suscetibilidade em diferentes patossistemas. Cia (2005) verificou que a aplicação de Acibenzolar-S-metílico, na proporção de 1000 mg i.a. L⁻¹, foi eficiente em aumentar a atividade da peroxidase em frutos de mamão tratados antes da inoculação com o fungo *C. gloeosporioides*. Em cultivares resistentes de *Xanthomonas sagittifolium* a atividade da peroxidase aumentou 41%, dois dias após a inoculação de *Pythium myriotylum*. Porém, em cultivares suscetíveis, a atividade dessa enzima aumentou apenas 13% (Boudjeko et al., 2005).

A fenilalanina amônia-liase (FAL) é a enzima do metabolismo secundário mais intensivamente estudada em vegetais, devido à importância nas reações do metabolismo de compostos fenólicos (Schwan-Estrada et al., 2008). Essa enzima é responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido *trans*-cinâmico e amônia. O ácido *trans*-cinâmico pode ser incorporado em muitos diferentes compostos fenólicos (ácido 4-coumárico, ácido cafêico, ácido felúrico e ácido sinápico), os quais estão presentes na formação de ésteres, coumarinas, flavanóides e ligninas. A FAL já foi isolada de algas, fungos, bactérias e principalmente de plantas superiores, não tendo sido ainda detectada em células de tecidos animais (Xiang & More, 2002; Beltrame, 2010). Nas plantas, a FAL realiza diferentes funções, como, por exemplo, o suporte mecânico, ação antioxidante, absorção da radiação UV, fatores antinutritivos, proteção

contra patógenos como moléculas sinalizadoras (Dixon & Paiva, 1995). Em trabalho realizado por Danner et al. (2008), tanto o acibenzolar-S-metílico quanto a proteína harpina, aplicados em pêssegos na pós-colheita, aumentaram a atividade da FAL, fato refletido na redução da área lesionada em frutos tratados e posteriormente inoculados com o fungo *Monilinia fruticola*. Anteriormente, Zeyen et al. (1995), verificaram que a supressão da atividade da FAL inibiu tanto a reação de hipersensibilidade em folhas de cevada quanto reduziu a infecção por *Erysiphe graminis* f. sp. *borderi*.

As polifenoloxidasas (PFO) são enzimas que contêm dois átomos de cobre no centro de reação, sendo capazes de inserir um átomo de oxigênio em um grupo hidroxila existente de um composto fenólico, seguida pela adição do difenol na quinona correspondente. Essa reação tem o O_2 como principal agente oxidante (Meyer et al., 2006; Beltrame, 2010). As PFO, também são conhecidas como tirosinases, cresolases, catecolases, difenolases e fenolases, sendo enzimas que ocorrem em plantas, animais, bactérias e fungos (Beltrame, 2010). Tais moléculas atuam sobre uma grande variedade de substratos e estão envolvidas no escurecimento de frutas e outros vegetais como cereais e leguminosas (Meyer et al., 2006). Os ataques de patógenos em vegetais podem alterar a atividade das PFOs (Yoruk & Marshall, 2003), assim, foi constatado que híbridos somáticos de batateira com maior atividade de PFO também são mais resistentes a *Erwinia carotovora* (Mustafa & Alawami, 2012). Por sua vez, sementes de tomate e pimentão tratadas com *Pseudomonas fluorescens* geraram plantas mais resistentes a *Pythium aphanidermatum*, sendo que essa resistência foi relacionada com aumentos na atividade de PFO (Ramamoorthy et al., 2002).

Enzimas do tipo superóxido-dismutase (SOD), peroxidase (POX) e catalase (CAT) são enzimas antioxidantes e que, portanto, regulam as espécies reativas de oxigênio (ERO). As EROs são moléculas reduzidas, transitórias e altamente reativas, produzidas no caminho metabólico de transformação do oxigênio molecular (O_2) a água (H_2O) (Baker & Orlandi, 1995). A partir da adição de um simples elétron, o oxigênio molecular é convertido ao radical superóxido (O_2^-), um processo mediado por peroxidases ou NADPH-oxidasas associadas à membrana, ou mesmo por lipoxigenases a partir de ácidos graxos e O_2 (Mehdy, 1994). O superóxido formado pode passar por reações de oxidorredução ou ser “dismutado” e regenerar o O_2 e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o que pode ocorrer espontaneamente em pH neutro ou pela ação da enzima superóxido dismutase. O H_2O_2 formado pode sofrer diferentes transformações: reduzido ao radical hidroxil ($OH^\bullet$); convertido a H_2O e O_2 pela ação da catalase; convertido a H_2O pela oxidação de moléculas substratos, como ascorbato, via peroxidases. As EROs podem se acumular rapidamente no início do processo infeccioso em ambas as interações patógeno-hospedeiro, compatíveis ou incompatíveis, um processo conhecido como explosão oxidativa (Lamb et al., 1989). Essas enzimas são avaliadas em diversos trabalhos de indução de resistência, incluindo os que verificam o processo na pós-colheita de frutos e, geralmente, servem de parâmetros para a avaliação da eficiência de um agente indutor. Alamino et al. (2013) constataram aumento significativo dos níveis de SOD e CAT em maçãs tratadas com acibenzolar-S-metílico e com a proteína harpina, após inoculação com *C. gloeosporioides*. Os mesmos eliciadores já haviam demonstrado potencial indutor em feijoeiros tratados e, posteriormente, desafiados com a bactéria *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*, onde se observou níveis significativamente maiores de SOD em plantas tratadas em relação às não tratadas (Bressan, 2011).

As respostas bioquímicas de defesa das plantas não são exclusivamente enzimáticas. Muitos estudos têm demonstrado que os fenóis participam ativamente desse processo (Poole et al., 1998; Romanazzi et al., 2012; Cia et al., 2007). Os compostos fenólicos são encontrados em todas as plantas. De acordo com a cadeia do esqueleto de carbono, as principais classes desse grupo químico incluem: C_6 (fenóis simples), C_6-C_1 (ácidos fenólicos), C_6-C_2 (ácidos fenilacéticos), C_6-C_3 (coumarinas, fenilpropanos), C_6-C_4 (naftoquinonas), $C_6-C_1-C_6$ (xantonas), $C_6-C_2-C_6$ (estilbenos), $C_6-C_3-C_6$ (flavonoides, isoflavonoides), $(C_6-C_3)_2$ (lignanais, neolignanais), $(C_6-C_3-C_6)_2$ (biflavonoides), $(C_6-C_3)_n$ (ligninas), $(C_6)_n$ (catecol) e $(C_6-C_3-C_6)_n$ (taninos) (Lattanzio et al., 2006; Beltrame, 2010). Alguns ocorrem constitutivamente, e são

considerados inibidores pré-formados de uma variedade de microrganismos (Stoessl et al., 1983; Nicholson & Hammerschmidt, 1992; Mansfield, 2000), sendo-lhes atribuída a função principal de proteção contra o ataque dos considerados não-patógenos ou apenas patógenos fracos. Trabalhos como o de Abe et al. (2007) comprovam tal fato uma vez que demonstram a presença de resveratrol, antocianinas e outros flavonoides em *Vitis* spp. não parasitadas. Adicionalmente, outros compostos fenólicos são formados especificamente em resposta à tentativa de ingresso de patógenos no interior da planta. A síntese desses compostos é considerada parte de uma resposta ativa de defesa do hospedeiro (Regasini et al., 2008). Esses compostos, que apresentam mais de 10 mil estruturas diferentes, apresentam um anel benzeno ligado à uma ou mais hidroxilas (fenol ou polifenóis, respectivamente) (Lattanzio et al., 2006; Taiz & Zeiger, 2012).

Os compostos fenólicos têm ação sobre fungos e bactérias, pela inibição da germinação de esporos, do crescimento micelial e por afetar a produção e/ou atividade de enzimas microbianas (Schwan-Estrada et al., 2008). A espécie *Achillea millefolium* L., uma Asteraceae comumente conhecida como milefólio ou mil-folhas, produz a apigenina, um composto fenólico que, segundo Singh et al. (1988), inibe a germinação de conídios de *Alternaria tenuissima*. A podridão na pós-colheita de maçãs, causada pelos fungos *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea*, foi reduzida em frutos tratados com o Acibenzolar-S-metílico e o fosfito de potássio, principalmente, pelo aumento nos teores de *trans*-resveratrol nos frutos (Sautter et al., 2008).

Muitos trabalhos têm focado na utilização, tanto do extrato da alga marinha *A. nodosum* quanto do fosfito de potássio, como indutores de resistência de plantas (Abreu et al., 2008; Peres et al., 2012; Dalio et al., 2014; Marcuzzo et al., 2016; Ribeiro et al., 2016; Borin et al., 2017; Gadaga et al., 2017). Além disso, produtos que apresentem bons resultados no controle de doenças em frutos e, adicionalmente, ofereçam pouco ou nenhum risco ao ambiente e à saúde do homem, como o extrato e o fosfito, são cada vez mais demandados tanto pelo mercado quanto pelo consumidor. Entretanto, pouco se sabe a respeito da correta utilização desses produtos na pós-colheita de frutas. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* e do fosfito de potássio, ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre o parasitismo do fungo *C. gloeosporioides* em mangas ‘Tommy Atkins’, na perspectiva da indução de resistência na fase de pós-colheita desses frutos.

3.2. Material E Métodos

Os ensaios descritos a seguir foram desenvolvidos em parceria do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ-USP, situado na cidade de Piracicaba-SP, com o Laboratório de Fitopatologia e com o Laboratório de Genética Molecular, situados na Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Campus São Luís, MA.

3.2.1. Obtenção do isolado

Frutos de manga, variedade ‘Tommy Atkins’, apresentando lesões típicas de antracnose, foram levados ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica – ESALQ-USP, lavados com água corrente e postos em condições de câmara úmida para acelerar o progresso da doença e o aparecimento de sinais do patógeno. Decorridos 4-5 dias, os frutos começaram a apresentar lesões enegrecidas, deprimidas na parte central e, sobre algumas dessas, ocorreu o aparecimento de uma massa mucilaginosa de coloração alaranjada, característica do processo de esporulação do fungo sobre o fruto. A partir dessa massa de esporos, foi feito o isolamento direto do patógeno para o meio de cultivo BDA (batata-dextrose-água), sendo em seguida, incubado em câmara tipo BOD a 25 ± 2 °C, fotoperíodo de 12

h, por 7 dias. Após esse período, o fungo foi novamente inoculado em manga sadia e reisolado, fechando-se assim o Postulado de Koch. A partir do reisolamento, foi obtida cultura pura do patógeno e, em um primeiro momento, a espécie foi confirmada por características morfológicas da colônia e do conídio, com auxílio de microscopia de luz e técnicas de microcultura (Figura 2.3A e 2.3B). Posteriormente, com o apoio do Laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual do Maranhão (Campus São Luís, MA), o isolado foi confirmado como sendo a espécie *C. gloeosporioides* por meio da técnica de PCR espécie-específica, mediante a análise da região ITS do rDNA do fungo, segundo protocolo proposto por Afanador-Kafuri et al. (2003) (Figura 2.3C).

Figura 3.1. *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de manga. **A.** Acérvulo do fungo com setas e fiáides conidiogênicas com produção abundante de conídios; **B.** Conídios baciliformes característicos da espécie *C. gloeosporioides*. **C.** Confirmação da espécie *C. gloeosporioides* (MC1), isolada de manga, variedade ‘Tommy Atkins’, a partir da amplificação da região ITS do rDNA, por PCR, utilizando o oligonucleotídeo CgInt (5'-GGCCTCCCGGGCGG-3'), específico da espécie, associado ao primer universal conservado ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTAGTATGC-3'), segundo metodologia de Afanador-Kafuri et al. (2003)

3.2.2. Avaliação da severidade da doença em mangas tratadas e inoculadas com o patógeno

As mangas da cultivar ‘Tommy Atkins’, utilizadas neste ensaio, foram obtidas na Central de Abastecimento de São Luís, CEASA, São Luís – MA, sendo todas oriundas de um mesmo produtor. Foram escolhidas visualmente aquelas que apresentaram padronização quanto ao tamanho, estágio fisiológico e coloração da casca. Após, as mangas foram levadas ao Laboratório de Fitopatologia da UEMA, sendo os pedúnculos destas padronizados para 20 mm de comprimento e, em seguida, lavadas com detergente neutro e água potável, higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 0,05%, lavadas mais uma vez em água potável, colocadas para secar no ambiente e separadas em badejas forradas com tripla camada de papel de filtro, sendo, em cada bandeja, depositados dois frutos.

O extrato da alga marinha *A. nodosum* utilizado, foi obtido comercialmente. O produto é distribuído no Brasil pela empresa canadense Acadian Seaplants, com o nome de Acadian® e apresenta em sua constituição 5,3% de K₂O e 6,0% de carbono orgânico total. É um extrato líquido, viscoso de coloração preta. Apresenta um odor característico de algas marinhas e pH que varia de 7,8 a 8,2. O fosfito de potássio, utilizado nos ensaios, também foi obtido comercialmente, sendo vendido com o nome Phytogard® e produzido pela Stoller do Brasil LTDA. Esse produto possui 28% de P₂O₅, cuja fonte é o ácido fosforoso, e 26% de K₂O, com densidade de 1,51 g L⁻¹, pH 7,0. Foram preparadas cinco deferentes concentrações para cada um dos produtos, conforme representado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Concentrações do extrato de algas marinhas (Acadian®) e do fosfito de potássio (Phytogard®) utilizadas nos testes

Concentração do Acadian® (v/v)	Concentração do Phytogard® (v/v)
0,0*	0,0*
0,1% ¹	0,1% ¹
0,3%	0,2%
0,5% ²	0,3% ²
1,0%	0,4%

*Tratamento controle (controle negativo)

¹Menor concentração recomendada pelo fabricante como fertilizante foliar na cultura da mangueira

²Maior concentração recomendada pelo fabricante como fertilizante foliar na cultura da mangueira

Além do controle negativo, representado pela concentração nula, demonstrado na Tabela 3.1., outros dois controles foram introduzidos nos testes sendo, o primeiro, composto por 150 µg de Amistar® (estrobilurina) L⁻¹, e o segundo, composto por 50 mg de Bion® (acibenzolar-S-metílico – ASM) L⁻¹, sendo este, o primeiro ativador de plantas registrado no Brasil (AGROFIT, 2005), por isso, selecionado como padrão de comparação para os ensaios de indução de resistência.

Após definidos os tratamentos, as suspensões do extrato de algas e as soluções do sal de potássio foram preparadas, acrescidas de Tween 20 (0,05%) e as mangas mergulhadas, por 5 min, em cada uma delas. Transcorrido esse tempo, os frutos foram depositados em bandejas forradas com tripla camada de papel de filtro. Depois de 24 h a aplicação dos tratamentos, os frutos foram inoculados com discos de micélio contendo estruturas vegetativas e reprodutivas do fungo *C. gloeosporioides*. A inoculação foi realizada por meio de ferimentos feitos com uma agulha de repicagem, na base do fruto e na região da inserção do pedúnculo, sendo em seguida, sobre a região injuriada, depositado o disco de micélio (5 mm de diâmetro). Após a inoculação, os frutos foram acondicionados em temperatura ambiente (25±2 °C), fotoperíodo de 12 h e 75±5% de UR, por 12 dias, sendo que, nas primeiras 48 h após a inoculação, as mangas foram mantidas também em condições de câmara úmida.

Assim que se retirou a câmara úmida, as avaliações dos frutos foram diárias e sempre no mesmo horário. Com o auxílio de um paquímetro, as lesões foram medidas, em sentidos diametralmente opostos, até o final do experimento. Com os dados coletados, foi calculado o diâmetro médio das lesões (mm), 12 dias após a inoculação, a velocidade de crescimento das lesões (mm dia⁻¹) e a área abaixo a curva de progresso da doença (AACPD), esta última, segundo a equação:

$$AACPD = \Sigma \left[\frac{(y_i + y_{i+1})}{2(t_{i+1} - t_i)} \right]$$

Onde, y_i é o diâmetro ou incidência de uma lesão no tempo t_i , em dias, e y_{i+1} é o diâmetro ou incidência da lesão no tempo t_{i+1} (De Capdeville et al., 2002).

Todos os tratamentos foram compostos por 5 repetições, sendo, cada parcela experimental, composta por dois frutos por bandeja. O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado. Com os dados obtidos, foram calculadas médias e estas submetidas à análise de variância, sendo comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, as diferentes concentrações dos produtos foram correlacionadas por análise de regressão polinomial, sendo considerados valores altamente correlacionados nos casos em que $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008).

3.2.3. Testes bioquímicos

Após os ensaios descritos acima, as cascas dos frutos foram retiradas, congeladas em nitrogênio líquido e enviadas ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ-USP, onde foram submetidas às análises bioquímicas. Os testes foram realizados ao longo do tempo, sendo que, para isso, foram determinados quatro tempos de coleta do material vegetal, sendo estes 3, 6, 9 e 12 dias após a inoculação do fungo *C. gloeosporioides*.

3.2.3.1. Obtenção do extrato proteico

O extrato proteico para a realização dos testes bioquímicos foi obtido a partir da maceração de 1,0 g de casca fresca de manga, de cada parcela experimental, na presença de nitrogênio líquido, seguida da adição de 4,0 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0). Sendo, em seguida, o homogenato centrifugado a 20.000 g por 25 min, a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados para a determinação do conteúdo total de proteínas e da atividade das enzimas β -1,3-glucanase, guaiacol peroxidase (POX), fenilalanina amônia-liase (FAL), polifenoloxidase (PFO), superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT).

O extrato proteico para a determinação da atividade da quitinase foi preparado em tampão borato de sódio. Assim, após a maceração de 1,0 g de casca fresca de manga em nitrogênio líquido, o preparado recebeu 4,0 mL de tampão borato de sódio 0,1 M (pH 8,8), contendo 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), 1 mM de diclorodifenilcloroetano (DDT) e 50 mM de ácido ascórbico. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 20.000 g por 25 min, a 4 °C e o sobrenadante coletado para a determinação enzimática, segundo protocolo proposto por Moerschbacher (1988), adaptado por Guzzo e Martins (1996).

3.2.3.2. Determinação do conteúdo total de proteínas das amostras

O conteúdo total de proteínas dos frutos, nos diferentes tratamentos, foi quantificado de acordo com Bradford (1976). Para tanto, 800 μ L de extrato proteico, preparado em tampão fosfato, recebeu 200 μ L do reagente de Bradford. Após 5 min, a absorbância foi determinada a 595 nm. A concentração de proteínas foi expressa em equivalentes de mg de albumina de soro bovino (ABS) g⁻¹ de amostra, sendo essa concentração determinada com base em curva padrão de ASB.

3.2.3.3. Atividade da enzima β -1,3-glucanase

A atividade dessa enzima foi realizada segundo Kombrink & Hahlbrock (1986). Para isso, o extrato proteico preparado em tampão fosfato foi utilizado nas seguintes reações: **reação** (1) – 150 μ L de laminarina 0,2%, previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), acrescido de 100 μ L do extrato proteico; **controle da reação** (2) – 150 μ L de laminarina 0,2%, previamente dissolvida em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 5,0), mais 100 μ L do extrato proteico e 125 μ L de ADNS (ácido 3,5-dinitrossalicílico); **branco** (3) – 150 μ L de laminarina 0,2%. As amostras foram incubadas a 40 °C por 4 h. Após, foram adicionados 125 μ L de ADNS aos tubos da reação (1) e do branco (3) e todas as amostras foram, então, incubadas a 95 °C por 5 min, seguidas de resfriamento em gelo. Após esse passo, as amostras receberam 1,5 mL de água e absorbância da glicose liberada foi determinada espectrofotometricamente a 410 nm, sendo esta obtida pela subtração da **reação** (1), glucanases hidrolisam a laminarina

liberando glicose, com o **controle da reação** (2), glucanases tratadas com ADNS não hidrolisam a laminarina. Os resultados foram expressos em μg de glicose min^{-1} mg de proteína $^{-1}$.

3.2.3.4. Atividade da enzima quitinase

Inicialmente, foi obtida a quitina coloidal (substrato para a quitinase) pela mistura de 10 g de quitina comercial, 100 mL de ácido fosfórico 85% e 2 L de água destilada. Após, 25 g da quitina coloidal obtida foram acrescidos de 100 mL de Remazol Brilliant Blue R (RBB Sigma®) e 25 mL de uma solução de dicromato de sódio 1,5% e tartarato de sódio e potássio 1,5%. Assim, atividade desta enzima nas mangas tratadas foi determinada pela mistura de 100 mg de substrato para quitinase, 800 μL de tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 5,0) e 100 μL do extrato proteico preparado em tampão borato de sódio. O homogenato foi colocado em banho maria, 100 °C, por 5 min e, após, centrifugado a 7000 g por 10 min. O sobrenadante obtido, foi levado ao espectrofotômetro e a absorbância das amostras determinada a 595 nm. A atividade da enzima foi determinada em curva padrão de proteína, também determinada em tampão borato de sódio, sendo expressa em unidade de quitinase mg de proteína $^{-1}$ (Guzzo & Martins, 1996).

3.2.3.5. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase (POX)

A atividade da guaiacol peroxidase foi determinada espectrofotometricamente, a 470 nm, em reação que consistiu de:

- 2,9 mL do tampão de reação (tampão fosfato de sódio 10 mM [pH 6,0], guaiacol 2,3 mM e H_2O_2 a 2,9 mM);
- 0,1 mL do extrato proteico preparado em tampão fosfato.

Na reação, a guaiacol peroxidase converte o guaiacol em tetraguaiacol. O homogenato foi monitorado por 1 min, com as medidas de densidade ótica tomadas a cada 6 s. Os resultados foram expressos em $\Delta \text{abs}_{470\text{nm}} \text{min}^{-1}$ mg de proteína $^{-1}$, segundo protocolo proposto por Roncatto & Pascholati (1998).

3.2.3.6. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade da fenilalanina amônia-liase foi determinada pela quantificação do ácido *trans*-cinâmico liberado a partir da fenilalanina, segundo Umesha (2006). Para isso, 100 μL de extrato proteico, preparado em tampão fosfato de sódio (pH 5,0), foi acrescido de 400 μL de tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8), mais 500 μL de L-fenilalanina 100 mM preparada em tampão Tris-HCl 25 mM (pH 8,8). Em seguida, a mistura foi incubada a 40 °C por 4 h. Após, a reação foi paralisada pela adição de 60 μL de HCl 5 M, seguido de resfriamento em banho de gelo.

A concentração do ácido *trans*-cinâmico das amostras foi determinada com base em curva padrão expressa em μg de ácido *trans*-cinâmico min^{-1} mg de proteína $^{-1}$.

3.2.3.7. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO)

A atividade da polifenoloxidase foi determinada pela conversão do catecol em quinona, onde 900 μL de catecol a 20 mM, preparado em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), foi acrescida em 100 μL de extrato proteico preparado em tampão fosfato (pH 5,0). A reação foi monitorada por 1 min, sendo as medidas das absorbâncias

registradas a cada 6 s, sendo, o comprimento de onda utilizado, 420 nm. Os resultados obtidos foram então, expressos em $\Delta \text{abs}_{420\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$ (Duangmal & Apenten, 1999).

3.2.3.8. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD)

A atividade da superóxido-dismutase foi determinada de acordo com a metodologia proposta por Gupta et al. (1993), adaptada por Beltrame (2010). Assim, 200 μL de extrato proteico, preparado em tampão fosfato, foi acrescido de 1,0 mL de uma mistura de reação composta de:

- Tampão fosfato de potássio 5 mM (pH 7,4);
- Metionina 9,9 mM
- Azul de nitrotetrazolium 57 μM (NBT)
- 0,025% de Triton X-100

Após, ao homogenato, foi acrescido 100 μL de riboflavina 44 mM.

A absorbância das amostras foi determinada a 560 nm antes e após a incubação sob luz fluorescente, por 20 min, a 28 °C. A atividade da SOD foi calculada segundo Asada et al. (1974), através da determinação da razão entre as absorbâncias de cada amostra. Nas condições do ensaio, uma unidade de SOD foi definida como a quantidade de enzima necessária para inibir em 50% a fotoredução do NBT. Os resultados do teste foram expressos em unidades de SOD mg de proteína⁻¹.

3.2.3.9. Atividade da enzima catalase (CAT)

A reação para a determinação da atividade da catalase consistiu de uma mistura composta por 1,45 mL de H_2O_2 em tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,8), sendo que a reação foi iniciada pela adição de 50 μL de extrato proteico, preparado em tampão fosfato. As medidas de redução da absorbância foram tomadas a 240 nm, redução essa resultante da degradação do H_2O_2 , sendo que a reação foi monitorada por 1 min e os valores registrados a cada 6 s. Os resultados foram expressos em unidades de CAT mg de proteína⁻¹, onde uma unidade de CAT correspondeu à decomposição de 1 μmol de H_2O_2 por min, nas condições em que estes testes foram realizados (Beers & Sizer, 1952).

3.2.3.9. Determinação do conteúdo total de fenóis

As cascas frescas dos frutos, tratadas e parasitadas pelo fungo *C. gloeosporioides*, obtidas conforme descrito em 3.2.3., foram maceradas na presença de nitrogênio líquido e liofilizadas por 6 h. Em seguida, 30 mg de cada amostra foram transferidos para tubos tipo Eppendorf de 2,0 mL de capacidade, sendo acrescidos de 1,5 mL de metanol 80% e agitados, em mesa rotativa a 150 rpm, *overnight*, protegidos da luz. Após, o extrato metanólico foi centrifugado a 12.000 g por 5 min e o sobrenadante transferido para novo tubo.

Para a quantificação dos compostos fenólicos solúveis totais, 150 μL do extrato metanólico foi acrescido de 150 μL do reagente Folin-Ciocalteu a 0,25 N e mantido a temperatura ambiente por 5 min. Em seguida, foi acrescentado à mistura, 150 μL de Na_2CO_3 1,0 M, sendo, em seguida, o preparado homogeneizado e incubado por 10 min a temperatura ambiente. Após esse tempo, o homogenato recebeu 1,0 mL de água destilada e deionizada, sendo mantido, em seguida, em temperatura ambiente por 1 h. A absorbância do preparado foi determinada a 750 nm e o conteúdo total de fenóis de cada amostra foi determinado com base em uma curva padrão de catecol, sendo os valores expressos em mg de catecol g de tecido seco⁻¹ (Beltrame, 2010).

3.2.3.10. Análises estatísticas

Os ensaios foram realizados de maneira independente para o extrato de *A. nodosum* e para o fosfito de potássio. Todos os tratamentos descritos acima continham cinco repetições e as leituras, para cada parcela, foram realizadas em triplicata. Todos os ensaios foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. Os valores obtidos foram transformados em médias e estas comparadas pelo teste de Scott-Knott, $p \leq 0,05$. A correlação das concentrações dos produtos utilizadas *versus* o parâmetro analisado, foi determinada a partir de análise de regressão polinomial, sendo considerados valores altamente correlacionados nos casos em que $R^2 \geq 0,70$ (Toledo & Ovalle, 2008). Todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.3. Resultados E Discussão

3.3.1. Avaliação da severidade da antracnose em mangas tratadas e inoculadas com o patógeno

A avaliação do diâmetro médio das lesões (mm), das mangas tratadas com o extrato de algas marinhas, ao final de 12 dias após a inoculação, demonstrou que os frutos apresentaram menores valores para este parâmetro, quando comparados ao controle negativo (concentração zero). Todos os tratamentos com o extrato da alga foram, significativamente, menores do que o referido controle e a concentração de 1,0% foi a mais eficiente em impedir o desenvolvimento das lesões nos frutos. O tratamento dos frutos com a estrobilurina também foi eficiente em diminuir a severidade da doença, contudo, não foi melhor do que a concentração de 1,0% do extrato de algas. O ASM diminuiu as lesões do patógeno nos frutos, quando comparado ao controle negativo. Contudo, o indutor não foi estatisticamente melhor do que os demais tratamentos. O aumento das concentrações do extrato implicou em diminuição no tamanho das lesões nas mangas parasitadas por *C. gloeosporioides* ($R^2 = 0,88$) (Figura 3.2.A).

De maneira análoga ao observado para o diâmetro das lesões, a avaliação da velocidade de crescimento da lesão (mm dia^{-1}), mostrou que o extrato de *A. nodosum* conferiu aos frutos a capacidade de impedir o avanço acelerado do patógeno pelos tecidos sadios das mangas. Todas as concentrações do extrato de algas testadas, impediram o avanço do fungo, com destaque para a maior (1,0%). Assim como no ensaio anterior, a estrobilurina foi eficiente em retardar o avanço de *C. gloeosporioides* no fruto, contudo, não foi melhor do que a maior concentração do extrato utilizada. O ASM inibiu o avanço do patógeno nos frutos, quando comparado à concentração zero, não sendo mais eficiente do que os demais tratamentos. Houve diminuição progressiva da velocidade de crescimento das lesões nos frutos a medida que se aumentou as concentrações do extrato de algas ($R^2 = 0,89$) (Figura 3.2.B).

A AACPD também foi diminuída pelo tratamento das mangas com o extrato de algas. Todos os tratamentos foram significativamente menores do que o controle negativo, sendo os mais eficientes, a concentração de 1,0% do extrato de algas e o controle promovido pelo fungicida estrobilurina. Nessa análise, nenhum dos tratamentos com o extrato foi mais eficiente que o tratamento com o ASM e o aumento progressivo das concentrações do extrato implicou diretamente em diminuição também progressiva da AACPD ($R^2 = 0,92$). Esses dados estão representados na Figura 3.2.C.

O perfil das lesões geradas pelo parasitismo de *C. gloeosporioides*, ao final dos ensaios, pode ser observado na Figura 3.3.

Figura 3.2. Avaliação da severidade da antracnose em frutos de manga, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratados com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Diâmetro das lesões (mm), 12 dias após a inoculação do patógeno; **(B)** Velocidade de crescimento das lesões (mm dia⁻¹), calculada com base no diâmetro da lesão medido no 12º dia menos o diâmetro da lesão medido no 11º dia; **(C)** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) das mangas tratadas. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato da alga marinha *A. Nodosum* utilizadas. ASM: Acibenzolar-S-metílico. Letras minúsculas dentro de um mesmo parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 3.3. Perfil das lesões geradas pelo parasitismo do fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, 12 dias após a inoculação, em mangas do cultivar “Tommy Atkins” tratadas com diferentes concentrações percentuais do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum*. Controle: frutos tratados apenas com água (concentração zero); ASM: acibenzolar-S-metílico

A avaliação da severidade da antracnose em mangas tratadas com o fosfito de potássio e posteriormente inoculadas com o fungo *C. gloeosporioides*, está representada na Figura 3.4. O diâmetro das lesões (mm), gerado pelo parasitismo do patógeno sobre os frutos após 12 dias da inoculação do fungo, foi menor em todas as mangas tratadas com o fosfito, quando comparadas com o controle negativo (concentração zero). O produto não foi mais eficiente em inibir o desenvolvimento das lesões nos frutos do que o ASM e o tratamento com o fungicida estrobilurina foi o que proporcionou, estatisticamente, os menores valores observados nesse parâmetro. Mesmo não havendo diferença significativa entre os tratamentos com o sal de potássio, observou-se que o aumento da concentração do produto, implicou em menores valores para o diâmetro da lesão nas mangas ($R^2 = 0,84$) (Figura 3.4.A).

O mesmo perfil de resposta observado na análise do diâmetro da lesão, foi observado para a velocidade de crescimento da lesão (mm dia^{-1}). Todos os tratamentos diferiram do controle negativo (concentração zero). A aplicação do fosfito de potássio em mangas não diferiu estatisticamente das mangas tratadas com o ASM, em termos de velocidade de crescimento da lesão por dia analisado. Adicionalmente, o melhor tratamento em retardar o avanço de *C. gloeosporioides* nos frutos, foi o fungicida estrobilurina. Assim como no ensaio anterior, mesmo não havendo diferença significativa entre os tratamentos com o sal de potássio, observou-se que o aumento da concentração do produto, implicou em menores valores para a velocidade de crescimento da lesão nas mangas ($R^2 = 0,84$) (Figura 3.4.B).

Com relação a área abaixo da curva de progresso da doença, da mesma maneira, todos os tratamentos utilizados foram eficientes em diminuir a AACPD, indicando, menor avanço do patógeno nos frutos tratados, quando comparados ao controle negativo (concentração zero). As concentrações 0,3% e 0,4% do extrato, foram iguais ao tratamento com o ASM, e este último foi, significativamente, melhor do que as concentrações 0,1% e 0,2% do sal de potássio utilizadas. Assim como nos ensaios anteriores, o tratamento com o fungicida estrobilurina foi o melhor,

estatisticamente, na redução da AACPD nos frutos, quando comparado ao controle negativo. Doses crescentes do fosfito implicaram em valores decrescentes da AACPD nos frutos ($R^2 = 0,92$). Esses resultados estão representados na Figura 3.4.C.

As lesões geradas nas mangas tratadas com o fosfito de potássio e posteriormente inoculadas com o fungo *C. gloeosporioides*, 12 dias após a inoculação do patógeno, podem ser observadas na Figura 3.5.

Figura 3.4. Avaliação da severidade da antracnose em frutos de manga, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratados com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Diâmetro das lesões (mm), 12 dias após a inoculação do patógeno; **(B)** Velocidade de crescimento das lesões (mm dia⁻¹), calculada com base no diâmetro da lesão medido no 12º dia menos o diâmetro da lesão medido no 11º dia; **(C)** Área abaixo da curva de progresso da doença (AACPD) nas mangas tratadas. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. ASM: Acibenzolar-S-metílico. Letras minúsculas dentro de um mesmo parâmetro, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 3.5. Perfil das lesões geradas pelo parasitismo do fungo *C. gloeosporioides*, 12 dias após a inoculação, em mangas, cultivar 'Tommy Atkins', tratadas com diferentes concentrações percentuais do fosfito de potássio. Controle: frutos tratados apenas com água (concentração zero); ASM: acibenzolar-S-metílico

Muitas propriedades da alga marinha *A. nodosum* têm sido estudadas e estão descritas na literatura, como, por exemplo, a promoção de crescimento em plantas e o uso na alimentação animal (Colapietra & Alexander, 2006; Jayaraman et al., 2011), incrementos na germinação de sementes (Carvalho et al., 2013), aumento da atividade de moléculas antioxidantes, de flavonoides e de compostos fenólicos em plantas (Fan et al., 2014; Lolo-Luz et al., 2014), aumento na atividade de enzimas de defesa vegetal, como peroxidases, fenilalanina amônia-liase e quitinase (Jayaraj et al., 2008) e incrementos diversos como teor de ácido ascórbico, clorofila e capacidade de absorção de nutrientes (Battacharyya et al., 2015). Especificamente sobre a defesa vegetal, a capacidade protetora do extrato está em gerar estímulos químicos na planta tratada, que culminam em uma série de reações induzidas e bastante diversificadas, que incluem moléculas diversas como oligossacarídeos, polissacarídeos, lipídeos, glicoproteínas, proteínas e outros peptídeos (Vander et al., 1998; Klarzynski et al., 2000).

Vários trabalhos atestam o potencial da alga marinha *A. nodosum*, aplicada na forma de extrato, na proteção de plantas ou órgãos vegetais específicos. Jayaraj et al. (2008) constataram que a aplicação do extrato de *A. nodosum* possibilita a redução da severidade de duas doenças na cultura da cenoura, geradas pelo parasitismo dos fungos *Alternaria radicina* e *Botrytis cinerea*. Em pepinos cultivados em casa de vegetação, o extrato apresentou potencial em reduzir a severidade de doenças causadas pelos patógenos *Alternaria cucumerinum*, *Didymella applanata*, *Fusarium oxysporum* e *B. cinerea* (Jayaraman et al., 2011). Oliari (2014), avaliando o extrato no controle da podridão parda, causada pelo fungo *Monilinia fruticola*, em ameixas, verificou que o produto reduziu a AACPD nos frutos em até 46,77%, igualando-se aos frutos tratados com o fungicida iprodione. Marttner et al. (2014) demonstraram que o extrato de algas marinhas não diluído, elaborado a partir da combinação das algas *Durvillaea potatorum* e *A. nodosum* suprimiu a formação de escleródios de *Sclerotinia minor* em 90%, além de reduzir a severidade da doença em alface.

Resultados semelhantes aos obtidos nos ensaios com o extrato de algas estão presentes em pesquisas recentes. O efeito protetor do Acadian®, na qualidade pós-colheita de frutos já foi demonstrado em mamões parasitados por *C. gloeosporioides* (Ribeiro et al., 2016). Nesse trabalho, os autores, aplicando duas concentrações do produto (40 e 60 mL L⁻¹), conseguiram reduzir a doença em até 17,4%. Em goiabas tratadas com o Acadian® e posteriormente inoculadas com o fungo *C. gloeosporioides*, o produto, nas concentrações de 5 e 10 mL L⁻¹, foi eficiente em reduzir o diâmetro das lesões nos frutos e a AACPD, quando comparadas ao controle (Sousa, 2017).

Mesmo não tendo seu modo de ação completamente descrito, a aplicação dos fosfitos no controle de doenças pode ser recomendada e feita ao longo de todo o ciclo da planta (Araújo et al., 2008). Os fosfitos agem como fertilizantes foliares e apresentam efeito fungistático, portanto, atuando indiretamente e diretamente sobre o fungo. Entretanto, embora entender como se dá o efeito direto do produto sobre o metabolismo de fitopatógenos importantes economicamente para os cultivos seja o principal alvo de algumas pesquisas, este não é o único mecanismo de ação do produto no controle de doenças (Blum et al., 2007; Dalio et al., 2014). Assim, o controle resulta de uma ação mista envolvendo a capacidade fungistática do produto e também, a ativação do sistema natural de defesa da planta, como a síntese de fitoalexinas e proteínas relacionadas com a patogênese (proteínas-RP), culminando com a diminuição da doença (Smillie et al., 1989; Blum et al., 2007).

Também se encontram na literatura, vários registros do efeito do fosfito de potássio sobre a qualidade fitossanitária na pós-colheita de frutas. Brackmann et al. (2004), avaliando o controle de fosfitos sobre podridões pós-colheita em maçãs ‘Fuji’ verificaram que os frutos tratados com o fosfito de potássio, na concentração de 250 mL 100 L⁻¹, exibiam menor incidência de podridões e o menor diâmetro de lesões. Blum et al. (2007) avaliaram o efeito do fosfito de potássio e do fosfito de cálcio no controle do mofo azul, também em maçãs, causado pelo fungo *Penicillium expansum*. Os autores verificaram que os frutos mergulhados nas preparações de fosfito foram os menos afetados pelo patógeno. Destacaram ainda que, a aplicação de fosfito de potássio na concentração de 1,5 mL L⁻¹, foi a mais eficiente no controle da doença nos frutos.

No manejo da antracnose, alguns trabalhos, como o de Ferraz (2010), destacam o efeito do produto sobre a doença. A autora verificou a ação dos fosfitos de magnésio, zinco e potássio em goiabas produzidas em cultivo comercial e orgânico. Foi verificado que o produto, em todas as concentrações testadas (1, 2 e 2,5%), diferiu significativamente da testemunha quanto ao diâmetro das lesões em frutos inoculados, obtidos tanto em sistema de produção convencional quanto orgânico. Em bananas ‘Prata’, o fosfito de potássio aplicado na concentração de 100 µL mL⁻¹, reduziu a severidade da antracnose nos frutos, causada por *C. musae*, em até 84% (Oliveira et al., 2016). Em feijoeiro comum, fosfitos de potássio e magnésio reduziram a severidade da antracnose, causada por *C. limdemuthianum*, em 74 e 81%, respectivamente (Gadaga et al., 2017).

3.3.2. Testes bioquímicos

3.3.2.1. Conteúdo total de proteínas e atividade das enzimas β-1,3-glucanase e quitinase

O conteúdo total de proteínas nas mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *A. nodosum*, e posteriormente inoculadas com o fungo *C. gloeosporioides*, está representado na Figura 3.6. Todos os tratamentos diferiram significativamente do controle negativo (concentração zero), uma vez que a média do conteúdo total de proteínas nas amostras analisadas foi maior em todos os casos, quando comparadas com a média do referido controle. Em todos os tempos de coleta, as concentrações de 0,5% e 1,0% do extrato de algas foram as melhores em induzir o acúmulo de proteínas nos frutos. Ambas foram superiores, inclusive, aos tratamentos

com o ASM e o fungicida estrobilurina, sendo a concentração de 1,0%, a que mais influenciou, significativamente, esse parâmetro nos diferentes tempos de análise. O aumento progressivo das concentrações o extrato de algas, implicou em aumentos também progressivos para o acúmulo de proteínas nas amostras, como pode ser verificado nos altos valores de R^2 expressos na figura abaixo.

Figura 3.6. Conteúdo total de proteínas (mg de proteína g⁻¹ de tecido fresco), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Conteúdo total de proteínas nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato da alga marinha *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Nas mangas tratadas com o fosfito de potássio, também se observou acúmulo de proteínas nos frutos em função dos diferentes tratamentos utilizados, como pode ser observado na Figura 3.7. Apenas nos frutos avaliados após 9 dias da inoculação de *C. gloeosporioides*, observou-se diferença significativa, quanto ao parâmetro analisado, para todos os tratamentos utilizados (Figura 3.7.D). Nos demais tempos de coleta, a concentração de 0,1% do sal de potássio, não diferiu significativamente do controle negativo. Nenhum dos tratamentos aplicados foi melhor, estatisticamente, que o fungicida estrobilurina em induzir o acúmulo de proteínas nas mangas, contudo, no 6º, 9º e 12º dia após a inoculação do fungo, a concentração 0,4% do fosfito se igualou, em termos de teor de proteínas nos frutos,

à estrobilurina (Figuras 3.7.C, D e E, respectivamente). No 3º dia de avaliação, as concentrações 0,3% e 0,4% foram estatisticamente iguais ao fungicida (Figura 3.7.B). Com relação ao ASM, padrão brasileiro de indução de resistência, nos três últimos tempos de coleta, a maior concentração do fosfito induziu maior acúmulo de proteínas nas amostras. No terceiro dia de avaliação, nenhuma das concentrações do sal de potássio utilizadas, foi estatisticamente melhor que o ASM. Finalmente, a análise de regressão polinomial, aplicada aos diferentes tempos de análise, demonstrou que o aumento progressivo da concentração de fosfito de potássio, gera aumentos, também progressivos, no teor de proteínas totais em mangas ($R^2 > 0,90$).

Figura 3.7. Conteúdo total de proteínas (mg de proteína g⁻¹ de tecido fresco), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Conteúdo total de proteínas nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A atividade da enzima β -1,3-glucanase, em mangas da cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *A. nodosum*, está representada na Figura 3.8. De modo geral, foi possível verificar que todos os tratamentos utilizados aumentaram, significativamente, a atividade da referida enzima, em comparação ao controle negativo (concentração zero). Em todos os tempos de coleta das cascas dos frutos, as concentrações 0,5% e

1,0% foram superiores, inclusive, aos tratamentos com o ASM e o fungicida estrobilurina, sendo, a concentração 1,0%, a mais eficiente em induzir a atividade da glucanase nos frutos (Figuras 3.8.A). A partir do ensaio, pôde-se aferir ainda que aumentos progressivos da concentração do extrato, quando aplicado nas mangas e nas condições em que estes testes foram conduzidos, implicam em aumentos também progressivos da atividade enzimática no fruto ($R^2 > 0,90$).

Figura 3.8. Atividade da enzima β -1,3-glucanase em mangas ($\text{mg de glicose min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima β -1,3-glucanase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Com relação ao perfil da enzima nos frutos tratados com o fosfito de potássio, também se observou que todos os tratamentos utilizados induziram maior atividade da β -1,3-glucanase, quando comparados ao controle negativo, como pode ser observado na Figura 3.9.A. No 3º dia de análise (Figuras 3.9.B), nenhum dos tratamentos com o sal de potássio foi superior, estatisticamente, ao ASM e ao fungicida estrobilurina. Adicionalmente, dentre as concentrações do produto utilizadas, 0,3% e 0,4% foram as que mais induziram a atividade da enzima. No 6º dia após a inoculação de *C. gloeosporioides*, verificou-se que a concentração de 0,4% do fosfito foi a melhor dentre as doses do produto utilizadas, sendo superior, inclusive, em termos de indução da glucanase, ao ASM, mas não ao fungicida

(Figura 3.9.C). No 9º e no 12º dia de análise, o sal de potássio foi, significativamente, melhor indutor da atividade da enzima, quando comparado aos demais tratamentos, na concentração de 0,4%, sendo esta superior, também, ao ASM e à estrobilurina (Figuras 3.9.D e E). Nas condições em que estes ensaios foram conduzidos e para todos os tempos de análise realizados, o aumento progressivo das concentrações do produto implica em aumentos também progressivos da atividade da glucanase ($R^2 > 0,90$).

Figura 3.9. Atividade da enzima β -1,3-glucanase (mg de glicose min^{-1} mg de proteína $^{-1}$), em mangas, cultivar 'Tommy Atkins', tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima β -1,3-glucanase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A atividade da enzima quitinase nas mangas tratadas com o extrato de *A. nodosum* está representada na Figura 3.10. De modo geral, para todos os tempos de coleta avaliados, todos os tratamentos utilizados foram eficientes em aumentar, significativamente, a atividade da quitinase nas mangas (Figura 3.10.A), quando comparados ao controle negativo (concentração zero). No 3º dia de avaliação, apenas a concentração de 1,0% do extrato foi superior, em indução da atividade da referida enzima, à utilização do ASM e do fungicida estrobilurina (Figura 3.10.B). No 6º, 9º e 12º dia após a inoculação dos frutos com o fungo *C. gloeosporioides*, as concentrações 0,5% e 1,0% foram,

estatisticamente, mais eficientes em induzir quitinase nos frutos que todos os demais tratamentos (Figuras 3.10.C, D e E, respectivamente). Em todos os tempos de análise, a concentração de 1,0% foi a que mais aumentou a atividade da quitinase, dentre os tratamentos. Além disso, a partir da análise de regressão polinomial aplicada aos ensaios, pode-se dizer que aumentos progressivos da concentração do extrato, implica em aumentos também progressivos da atividade da quitinase, como pode ser observado pelos altos valores de R^2 ($> 0,90$) nos gráficos.

Figura 3.10. Atividade da enzima quitinase (unidade de quitinase mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima quitinase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A atividade da quitinase nas mangas tratadas com o fosfito de potássio, está representada na Figura 3.11. Nos tempos de coleta 3 e 6 dias após a inoculação do patógeno (Figuras 3.11.B e C, respectivamente), todos os tratamentos diferiram, significativamente, do controle negativo. No 9º e 12º dia de avaliação, apenas a concentração de 0,1% não diferiu do referido controle (Figuras 3.11.D e E, respectivamente). No primeiro e no último tempo de coleta das amostras (3º e 12º dia após a inoculação de *C. gloeosporioides*), a concentração de 1,0% do extrato foi, significativamente superior, inclusive, aos controles ASM e estrobilurina (Figuras 3.11.B e E, respectivamente), na

indução de quitinase nos frutos. Na análise 6 dias após a inoculação do patógeno, essa mesma concentração foi superior ao padrão de indução de resistência utilizado, o ASM, a todas as demais concentrações do sal de potássio aplicadas nos frutos, mas não diferiu do fungicida estrobilurina (Figura 3.11.C). A avaliação das mangas tratadas e expostas por 9 dias ao parasitismo de *C. gloeosporioides*, demonstrou que os melhores indutores da atividade da quitinase são o ASM e a estrobilurina (Figura 3.11.D). Em todos os tempos analisados, o aumento da concentração do fosfito de potássio no tratamento de mangas ‘Tommy Atkins’, na fase de pós-colheita, significou aumentos também na atividade da quitinase nos frutos, como pode ser observado pelas análises de regressão polinomial apresentadas na figura abaixo ($R^2 > 0,90$, em todos os casos).

Figura 3.11. Atividade da enzima quitinase (unidade de quitinase mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima quitinase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

O aumento no conteúdo total de proteínas em plantas, em resposta a um agente indutor, seja ele biótico ou abiótico, é comum em sistemas naturais e em sistemas de produção. Klarzynski et al. (2003) relataram o aumento no conteúdo total de proteínas eliciadas por fucanas sulfatadas em plantas de tabaco, parasitadas pelo *Tobacco Mosaic Virus*.

Da mesma forma, Vera et al. (2011) observaram o mesmo efeito em diferentes patossistemas. Jayaraman et al. (2011), avaliando os efeitos do extrato comercial de *A. nodosum* (Stimplex®), observaram, além da redução da incidência de doenças em pepinos, causadas pelos patógenos *Alternaria cucumerinum*, *Didymella applanata*, *Fusarium oxysporum* e *Botrytis cinerea*, aumentos no conteúdo total de proteínas e na atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase. O mesmo foi observado em experimento semelhante desenvolvido por Abkoo & Sabbagh (2016), que avaliou o efeito do extrato no tratamento de pepinos parasitados por *Phytophthora melonis*. Em tomateiros tratados com o extrato da alga e, posteriormente, inoculados com os patógenos *A. solani* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, verificou-se, além de incrementos de 42% na produtividade, redução na severidade de ambas as doenças em 63% e 44%, respectivamente (Ali et al., 2016). Os autores destacam que, tais níveis de controle foram alcançados devido o aumento da atividade de enzimas de defesa, dentre elas a β -1,3-glucanase e a quitinase. Esses resultados estão de acordo com os observados neste trabalho em mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com o extrato.

O extrato da alga marinha *A. nodosum*, Acadian®, contém uma grande quantidade de compostos, que incluem moléculas de carboidratos, sendo, a maioria, na forma de oligossacarídeos, oligogalacturonídeos e alguns polissacarídeos (Alam et al., 2013). Oligossacarídeos são conhecidos por agirem como eliciadores de sinais moleculares em plantas (Ryan & Farmer, 1991; Vidhyasekaran, 1997; Walters et al., 2005). Os oligogalacturonídeos são móveis sistemicamente e, dependendo da massa molecular desses compostos, eles podem induzir várias enzimas relacionadas com a defesa em vegetais (Cluzet et al., 2004). Os polissacarídeos algais, a exemplo das laminarinas, carragenanas e fucanas, já demonstraram seu potencial em sinalizar para a ativação de genes de resistência em plantas de fumo (Mercier et al., 2001).

As laminarinas, são moléculas lineares formadas a partir de ligações de várias moléculas de glucana em arranjo β -1,3 e fucanas sulfatadas, abundantemente encontradas em algas marrons. Podem induzir várias respostas de defesa em alfafa e fumo, contra oídio no morangueiro e cereais, fogo bacteriano em macieira e fogo cinzento em videiras, sendo, essas respostas, constantemente atreladas à atividade das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase (Kobayashi et al., 1993; Klarzynski et al., 2000; Elmer & Reglinski, 2006; Renard-Merlier et al., 2007). As carragenanas compõem uma família de galactanas sulfatadas e são indutoras efetivas de respostas de defesa em tabaco (Mercier et al., 2001). Contudo, a eficiência da atividade eliciadora depende do tipo de carragenana, do seu grau de sulfatação e do patógeno envolvido. Dessa maneira, o pré-tratamento de plantas de *Arabidopsis* com λ -carragenana, altamente sulfatada, induz resistência a *Sclerotinia sclerotiorum*, resultando em lesões foliares menores. Por sua vez, ι -carragenana, apresentando menor grau de sulfatação, aumenta a severidade da doença (Sangha et al., 2010). As fucanas algais, também denominadas fucoidanas, são polissacarídeos lineares ou não, que têm como característica estrutural marcante a presença de L-fucose sulfatada. Estas são unidas, principalmente, por ligações glicosídicas do tipo α (1-3), com substituições nas posições 2, 3 ou 4, dependendo da espécie de alga (Berteau & Mulloy, 2003). Tanto laminarinas, quanto carragenanas e fucanas, são encontradas nas paredes das células de espécies de algas marrons, tais como *A. nodosum*, *Fucus* spp. e *Ecklonia* spp. (Stadnik & Paulert, 2008) e, provavelmente, sejam essas moléculas relacionadas com as respostas de defesa em vegetais.

Os fosfitos, ingredientes ativos constituintes de vários produtos usados no controle de fitopatógenos, podem agir diretamente sobre os microrganismos (Spolti et al., 2015), ou indiretamente, induzindo a resistência sistêmica ou local, pela síntese de fitoalexinas, compostos fenólicos e proteínas-RP diversas (Sautter et al., 2008; Carmona et al., 2011). Dessa forma, sais de potássio estão sendo usados com sucesso no controle de doenças causadas por diversos microrganismos, a exemplo do míldio em crucíferas, dependendo da concentração utilizada. Contudo, segundo os autores, a proteção promovida ocorreu apenas nos tecidos tratados, não havendo resposta sistêmica,

embora, seja sugerido no trabalho, a atuação sinérgica de modos de ação direto, sobre o patógeno, e indireto, ativando a defesa dessas hortaliças através da ativação de diversas proteínas de defesa (Bécot et al., 2000). Em mamoeiros, os fosfitos apresentam excelentes taxas de controle à podridão das raízes dessas plantas, causada por *Phytophthora palmivora*, onde foi verificado aumentos significativos na atividade da β -1,3-glucanase nas plantas tratadas (Tavares et al., 2010). No tratamento de abacaxizeiros contra *Fusarium guttiforme*, o produto reduziu a incidência da doença no campo em até 91,67% e, dentre os mecanismos utilizados pela planta para suprimir o patógeno, está a ativação das enzimas β -1,3-glucanase e quitinase (Melo et al., 2016).

O mecanismo de ação das β -1,3-glucanases em plantas está na capacidade da enzima em hidrolisar as paredes celulares dos fungos fitopatogênicos, o que causa, por consequência, lise da célula fúngica e controle da doença. Adicionalmente, as β -1,3-glucanases têm um efeito indireto na defesa das plantas, uma vez que essas enzimas são precursoras de vários oligossacarídeos com atividade elicitadora, os quais induzem a produção de outras proteínas-RP ou compostos antifúngicos de baixa massa molecular nos vegetais, como as fitoalexinas (Keen & Yoshikawa, 1983; Klarzynski et al., 2000; Ebrahim et al., 2011). Assim como as glucanases, as quitinases produzidas em plantas são, comumente, endoquitinases capazes de degradar a quitina, o maior constituinte da parede celular dos fungos e também, inibir o crescimento fúngico (Schlumbaum et al., 1986; Broekaert & Peumans, 1988). As quitinases presentes no meio extracelular, induzidas em resposta ao ataque de um fitopatógeno, podem agir diretamente sobre o microrganismo invasor, bloqueando o crescimento da hifa e com isso, liberando elicitores fúngicos, os quais induzem a biossíntese de mais quitinase e outras moléculas de defesa no vegetal (Barber et al., 1989; Mauch & Stachelin, 1989). Adicionalmente, há indicações de que β -1,3-glucanases e quitinases ajam em conjunto nas respostas de defesa das plantas ao ataque de fitopatógenos (Ebrahim et al., 2011).

3.3.2.2. Atividade da guaiacol-peroxidase (POX), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e polifenoloxidase (PFO)

A atividade da enzima guaiacol peroxidase (POX), nas mangas tratadas com as diferentes concentrações do extrato da alga marinha *A. nodosum*, está representada na Figura 3.12. Em todos os tempos de análise, a concentração de 1,0% foi, significativamente, a mais eficiente em incrementar a atividade da enzima nos frutos (Figura 3.12.A), além disso, o aumento da concentração do extrato de algas no tratamento de mangas, cultivar 'Tommy Atkins', na pós-colheita, implicou em aumentos progressivos da atividade da POX. A partir da análise das amostras coletadas 3 e 12 dias após a inoculação de *C. gloeosporioides*, foi possível observar que apenas a concentração 0,1% do extrato de algas não diferiu significativamente do controle negativo (concentração zero) (Figuras 3.12.B e E, respectivamente). Em contrapartida, no 6º e 9º dia de análise, todos os tratamentos foram mais eficientes em induzir a atividade da POX nos frutos, em relação à concentração zero (Figuras 3.12.C e D, respectivamente). Além disso, para todos os períodos avaliados, foi possível aferir também que as concentrações 0,5% e 1,0% do extrato foram, significativamente, melhores indutoras do que os tratamentos em que se utilizou o ASM e o fungicida estrobilurina.

Figura 3.12. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase (POX) ($\Delta_{\text{abs}470\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. (A) Atividade da POX nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; (B) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; (C) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; (D) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; (E) Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A atividade da POX, em frutos tratados com o fosfito de potássio está representada na Figura 3.13. Com exceção do tratamento com o fungicida estrobilurina, nos tempos de avaliação 6 e 9 dias após a inoculação dos frutos tratados (Figuras 3.13.C e D, respectivamente), todos os demais tratamentos diferiram, significativamente, do controle negativo, incrementando a atividade da enzima nos frutos. No primeiro tempo de avaliação (amostras coletadas no 3º dia após a inoculação), as concentrações 0,2%, 0,3% e 0,4% aumentaram significativamente a atividade da POX nos frutos, em relação a todos os demais tratamentos (Figura 3.13.B). No 6º e 9º dia de avaliação, as concentrações 0,3% e 0,4% induziram o acúmulo da enzima nas mangas e no 12º dia de coleta das amostras, as mesmas concentrações foram significativamente superiores ao ASM, entretanto, não diferiram do fungicida estrobilurina (Figuras 3.13.C, D e E, respectivamente). Em todos os casos, observa-se uma correlação entre o fator concentração utilizada *versus* atividade de POX nos frutos. Assim, quanto maior a concentração, maior foi a atividade da enzima nas amostras (valores de $R^2 > 0,90$ em todos os tempos de análise).

Figura 3.13. Atividade da enzima guaiacol-peroxidase (POX) ($\Delta \text{abs}_{470 \text{ nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima guaiacol-peroxidase nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

O perfil da enzima superóxido-dismutase (SOD), em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *A. nodosum*, está representado na Figura 3.14. Todos os tratamentos utilizados foram eficientes em induzir a atividade da SOD quando comparados ao controle negativo (concentração zero) (Figura 3.14.A). A análise das amostras 3 dias após a inoculação do fungo *C. gloeosporioides* mostrou que a concentração de 1,0% foi a melhor em induzir o acúmulo de SOD nos frutos, inclusive, que os tratamentos ASM e estrobilurina (Figura 3.14.B). Aos 6 dias, o mesmo se observou para as concentrações 0,5% e 1,0% (Figura 3.14.C) e, aos 9 e 12 dias após a inoculação do patógeno, as concentrações que melhor eliciaram, nos frutos, uma maior atividade da SOD foram a 0,3%, a 0,5% e a 1,0% do extrato da alga marinha (Figuras 3.14.D e E, respectivamente). Em todos os tempos de análise, o aumento da atividade da SOD esteve diretamente relacionado ao aumento da concentração do extrato, sendo maior a atividade da enzima quanto maior foi a concentração do produto utilizada.

Figura 3.14. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) (unidades de SOD mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da SOD nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Com relação ao fosfito de potássio, a atividade da SOD nos frutos tratados está representada na Figura 3.15. Nos tempos de coleta 3, 6 e 9 dias após a inoculação das mangas com *C. gloeosporioides*, somente a concentração de 0,1% não diferiu, significativamente, do controle negativo (Figuras 3.15.B, C e D, respectivamente). Nesses tempos de coleta, todos os demais tratamentos utilizados eliciaram respostas antioxidativas nos frutos a partir do aumento da atividade da SOD. No 12º dia após a inoculação, o que se verificou foi que todos os tratamentos foram estatisticamente superiores à concentração zero, aumentando a atividade da enzima nos frutos (Figura 3.15.E). No primeiro tempo de coleta do material vegetal (3 dias após a inoculação dos frutos com o patógeno), o melhor tratamento aplicado foi a concentração 0,4% do fosfito (Figura 3.15.B). No segundo tempo de coleta (6 dias após a inoculação das mangas), as concentrações 0,3% e 0,4% foram superiores ao ASM, mas não diferiram do tratamento com a estrobilurina (Figura 3.15.C). No 9º dia após a inoculação, somente a concentração 0,3% do sal de potássio diferiu do ASM, apresentando maior poder antioxidante. Entretanto, o melhor indutor da SOD, nesse tempo de coleta, foi o fungicida (Figura 3.15.D). Finalmente, no último tempo de coleta (12 dias após a inoculação dos frutos), as maiores concentrações de

fosfito utilizadas no tratamento das mangas (0,3% e 0,4%), apresentaram-se como as melhores indutoras da atividade da enzima SOD nas amostras, diferido de todos os demais tratamentos, incluindo o ASM e a estrobilurina (Figura 3.15.E). Incrementos na atividade da SOD estão altamente correlacionados com o aumento da concentração do fosfito de potássio ($R^2 > 0,90$, com exceção do 3º tempo de coleta – 9 dias após a inoculação dos frutos), uma vez que, quanto maior a concentração do sal, maior foi a atividade enzimática observada.

Figura 3.15. Atividade da enzima superóxido-dismutase (SOD) (unidades de SOD mg de proteína⁻¹), em mangas cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima SOD nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A atividade da catalase (CAT), em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o extrato da alga marinha *A. nodosum*, está representada na Figura 3.16. Em todos os tempos de coleta das amostras, o ASM não diferiu do controle negativo (concentração zero) em termos de indução da CAT e, aos 9 dias da inoculação dos frutos com o patógeno, o fungicida estrobilurina também não diferiu do referido controle (Figura 3.16.D). Todos os tratamentos com as diferentes concentrações do extrato de *A. nodosum* diferiram positivamente do controle negativo, incrementando a atividade da enzima nas mangas e aumentando a capacidade antioxidante desses frutos (Figura 3.16.A).

Adicionalmente, as concentrações 0,3%, 0,5% e 1,0% foram, significativamente, melhores eliciadoras da atividade da enzima que o ASM e o fungicida, aos 3 e 6 dias após a inoculação dos frutos com o patógeno (Figuras 3.16.B e C, respectivamente). Aos 9 e 12 dias, todas as concentrações o extrato de algas utilizadas incrementaram de modo mais evidente o conteúdo da CAT nas mangas tratadas em relação ao ASM e à estrobilurina (Figuras 3.16.D e E, respectivamente). O aumento da atividade CAT está altamente correlacionado com o aumento da concentração do extrato da alga, como pôde-se observar aos 3, 6 e 12 dias após a inoculação de *C. gloeosporioides* ($R^2 > 0,90$).

Figura 3.16. Atividade da enzima catalase (CAT) (unidades de CAT mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da CAT nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Assim como nas mangas tratadas com o extrato de algas, nas mangas mergulhadas no fosfito de potássio, também não se observou diferenças, significativas, entre o tratamento ASM e o controle negativo (concentração zero), para nenhum dos tempos de coleta de amostras (Figura 3.17.), em relação a atividade da CAT. Aos 3, 6 e 12 dias após a inoculação das mangas tratadas, as análises mostraram que todos os tratamentos com o sal de potássio, independente da concentração utilizada, foram melhores indutores da enzima que todos os demais tratamentos aplicados (Figuras

3.17.B, C e E, respectivamente). Aos 9 dias após a inoculação das mangas, somente a concentração de 0,1% de fosfito, dentre as concentrações do produto, não diferiu significativamente do controle negativo (Figura 3.17.D). No 3º e 6º dia de coleta, somente o tratamento 0,4% de fosfito diferiu dos controles ASM e estrobilurina, aumentando a atividade da CAT nos frutos (Figuras 3.17.B e C, respectivamente). No 9º dia de coleta, as concentrações 0,2%, 0,3% e 0,4% foram as melhores em induzir a atividade da enzima e, no 12º dia de coleta, todas as concentrações do fosfito aplicadas foram melhores que o ASM, não diferindo, contudo, do perfil observado da CAT em frutos tratados com a estrobilurina (Figuras 3.17.D e E, respectivamente). Em todos os tempos de coleta, aumentos progressivos das concentrações do sal, implicou em aumentos também progressivos da atividade da CAT nos frutos.

Figura 3.17. Atividade da enzima catalase (CAT) (unidades de CAT mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima CAT nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A enzima polifenoloxidase (PFO) é altamente influenciada pelo extrato de algas marinhas, como pode ser observado na Figura 3.18. Todos os tratamentos aplicados às mangas foram, significativamente, melhores indutores da atividade da PFO nos frutos que o controle negativo (concentração zero) (Figura 3.18.A). Nos tempos de coleta 3,

6 e 9 dias após a inoculação dos frutos com o fungo *C. gloeosporioides*, as concentrações 0,5% e 1,0% do extrato induziram os maiores teores da enzima nas amostras, sendo, as referidas doses, superiores também aos controles ASM e estrobilurina (Figuras 3.18.B, C e D, respectivamente). Aos 12 dias, além das concentrações já mencionadas, a concentração 0,3% também diferiu estatisticamente do ASM e do fungicida, com amostras apresentando maiores quantidades de PFO (Figura 3.18.E). Em todos os tempos de coleta, a concentração 1,0% do extrato da alga foi a que melhor eliciou a atividade da PFO nas mangas, além disso, ficou evidenciado a partir das análises de regressão polinomial que, quanto maior a concentração do extrato utilizada, maior foi a atividade da PFO observada nas amostras.

Figura 3.18. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO) ($\Delta \text{abs}_{420 \text{ nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da PFO nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Todos os frutos tratados com o fosfito de potássio, independente da concentração aplicada, assim como os frutos que receberam aplicações do ASM e do fungicida estrobilurina, apresentaram maior atividade da PFO do que o controle negativo (Figura 3.19). No primeiro tempo de coleta (3 dias após a inoculação das mangas com *C.*

gloeosporioides), os frutos que receberam as diferentes concentrações do sal de potássio, não apresentaram atividade da PFO superior aos controles ASM e estrobilurina, sendo este último, o melhor indutor neste tempo analisado (Figura 3.19.B). Aos 6 dias após a inoculação do patógeno, as amostras tratadas com 0,4% do sal apresentaram atividade da PFO semelhante ao observado para a estrobilurina e superior ao ASM (Figura 3.19.C). No 9º e 12º dia de análise, as mangas tratadas com 0,4% do fosfito apresentaram o maior perfil de atividade da PFO, diferindo, significativamente, dos demais tratamentos (Figuras 3.19.D e E, respectivamente). Aumentos na atividade da enzima estiveram altamente correlacionados com o aumento da concentração do sal de potássio aplicada ($R^2 > 0,90$).

Figura 3.19. Atividade da enzima polifenoloxidase (PFO) ($\Delta_{\text{abs}420\text{nm}} \text{ min}^{-1} \text{ mg de proteína}^{-1}$), em mangas, cultivar 'Tommy Atkins', tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima PFO nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Os vegetais, sob condições de estresse, como o ataque de patógenos, são induzidos a aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Magbanua et al., 2007). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), um tipo de ERO, está diretamente envolvido tanto com a morte do patógeno invasor quanto da célula hospedeira, além de estar intimamente relacionado com o reforço da parede celular do vegetal, em vista do favorecimento da formação de

ligações cruzadas com proteínas estruturais que tornam a parede mais resistente à degradação por enzimas líticas e toxinas não-seletivas liberadas pelo patógeno (Mehdy et al., 1994). Embora o H_2O_2 seja essencial para a sinalização de respostas de defesa na planta contra patógenos, a molécula pode reagir com o radical superóxido (O_2^-), ou íons metálicos, para formar o radical hidroxil ($OH^\cdot$), o qual é extremamente tóxico a patógenos (Lin et al., 2009). Estresses oxidativos causam a peroxidação de lipídeos na membrana celular e danos à pigmentos, proteínas e ácidos nucleicos (Apel et al., 2004).

Para remover o excesso de EROs gerado durante a interação patógeno-hospedeiro, os vegetais desenvolveram mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos (Scandalios Filha et al., 2011). As enzimas superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POX), polifenoloxidase (PFO), além da glutathione-S-transferase (GST), ascorbato peroxidase (APX), glutathione redutase (GR) e glutathione peroxidase (GPX), são moléculas comumente envolvidas na defesa do hospedeiro contra os estresses oxidativos (Hiraga et al., 2001; Arora et al., 2002; Mittler et al., 2002; Dixon et al. 2010; Debona et al., 2012). A SOD, a qual é responsável pela dismutação do radical O_2^- em oxigênio molecular e H_2O_2 , constitui-se na primeira linha de defesa contra estresses oxidativos (Bowler et al., 1992). Dessa forma, a determinação da atividade dessas moléculas em frutos, configura-se como uma forma indireta de mensuração do potencial indutor de resistência de indutores bióticos e abióticos, estando incluído nestes últimos, o extrato de *A. nodosum* e o fosfito de potássio. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho indicam que a resposta de defesa induzida em mangas, ao tratamento com o extrato de algas e o fosfito, perpassa pelo fenômeno da explosão oxidativa, promovido pelas EROs, e remoção dos níveis tóxicos dessas moléculas pelas enzimas POX, SOD, CAT e PFO, uma vez que, para os dois produtos aplicados, nas concentrações utilizadas e condições em que estes testes foram desenvolvidos, houve incrementos significativos da atividade dessas enzimas.

O aumento da atividade de enzimas antioxidantes em plantas e partes de plantas, tratadas com o extrato de *A. nodosum*, está descrito na literatura. Pepinos tratados com o referido extrato e, posteriormente, inoculados com diversos patógenos de forma isolada, apresentaram incrementos significativos para as enzimas POX, PFO e lipoxigenases (LOX) e consequente controle das doenças no vegetal (Jayaraman et al., 2011). Em tomateiros, o extrato aumentou a atividade das enzimas POX e PFO, em resposta ao parasitismo do fungo *Alternaria solani* e da bactéria *Xantomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Ali et al., 2016). A atividade antioxidante do extrato foi testada em células do tipo Caco-2, um tipo de célula epitelial humana, heterogênea, geradora de adenocarcinomas, desenvolvida pelo Instituto Sloan-Kettering para pesquisas com foco no tratamento do câncer (O'Sullivan et al., 2010). No trabalho, os autores verificaram o tratamento das células com extrato de *A. nodosum* por 24 h e posterior exposição destas ao H_2O_2 . Constataram que o extrato foi significativamente ($p < 0,05$) eficiente em aumentar as respostas antioxidantes, representadas pelo aumento da atividade das enzimas CAT e SOD. Além disso, o extrato foi eficiente em prevenir danos por oxidação à molécula de DNA. Provavelmente, efeito semelhante ocorra em células vegetais tratadas com o extrato.

Em cacaueiro, não foram observados aumentos na atividade da enzima POX nas plantas tratadas com diferentes concentrações de fosfito de potássio e, posteriormente, inoculados com o fungo *Verticillium dahliae* (Ribeiro Júnior et al., 2006). Em mamoeiro, Tavares et al. (2009) observaram aumentos significativos na atividade da enzima nas plantas tratadas com o fosfito e parasitadas por *Phytophthora palmivora*. No controle da podridão olho-de-boi em maçãs, causada por *Crytosporiopsis perennans*, o fosfito de potássio reduziu em 60% os danos da doença nos frutos, diminuiu em 66% a quantidade de inóculo sobre as maçãs e inibiu o desenvolvimento *in vitro* do fungo. Entretanto, o produto não alterou a atividade da POX nos frutos. A atividade das enzimas CAT, SOD e PFO, na fase de pós-colheita de frutas, já foi descrita para diversos indutores abióticos de resistência (Ma et al., 2013; Cao et al., 2014; Chen et al.,

2016; Perumal et al., 2017), mas não constam na literatura efeitos semelhantes aos observados nestes ensaios para o fosfito de potássio em respostas à estresses bióticos.

3.3.2.3. Atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL)

A atividade da FAL, em mangas tratadas com o extrato de *A. nodosum*, está representada na Figura 3.20. Todos os tratamentos, incluindo os controles ASM e o fungicida estrobilurina, em todos os tempos de coleta analisados, foram melhores indutores da FAL do que o controle negativo (concentração zero), sendo, a concentração 1,0% do extrato de algas, o tratamento mais eficiente em eliciar as respostas dessa enzima nas mangas (Figura 3.20.A). Nos tempos 3, 6 e 12 dias após a inoculação dos frutos com *C. gloeosporioides*, as concentrações 0,5% e 1,0% foram as que induziram maior atividade da FAL nos frutos, maior, inclusive, que os controles ASM e estrobilurina (Figuras 3.20.B, C e E). No 9º dia de análise, além das concentrações 0,5% e 1,0%, a concentração 0,3% também apresentou maior atividade da FAL quando comparada aos demais tratamentos (Figura 3.20.D). Em todos os tempos analisados, a concentração de 1,0% do extrato de *A. nodosum* foi a mais eficiente em aumentar a atividade da enzima nos frutos. Além disso, o aumento progressivo das concentrações do extrato se traduziu em aumentos também progressivos da atividade da FAL nas mangas.

Figura 3.20. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (mg de ácido *trans*-cinâmico min⁻¹ mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar “Tommy Atkins”, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da FAL nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Para os frutos tratados com o fosfito de potássio, a atividade da FAL está representada na Figura 3.21. Nesse caso, todos os tratamentos utilizados diferiram, significativamente, do controle negativo aumentando a atividade da enzima nos frutos (Figura 3.21.A). Em todos os tempos de coleta analisados, a concentração 0,4% do sal de potássio foi a que mais incrementou a atividade da FAL nos frutos, sendo superior estatisticamente, inclusive, aos controles ASM e estrobilurina. Pelas análises de regressão polinomial, pôde-se observar que aumentos progressivos da concentração de fosfito aplicado nas mangas, antes da inoculação com o fungo *C. gloeosporioides*, implicou em aumentos também progressivos da atividade da FAL nos frutos.

Figura 3.21. Atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) (mg de ácido *trans*-cinâmico min⁻¹ mg de proteína⁻¹), em mangas, cultivar 'Tommy Atkins', tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e posteriormente inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Atividade da enzima FAL nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Em cenouras, o extrato de algas, além de reduzir a severidade das doenças causadas pelos fungos *Alternaria alternata* e *Botrytis cinerea* 10 e 25 dias após a inoculação, aumentou a atividade da FAL e outras enzimas de defesa na raiz (Jayaraj et al., 2008). O mesmo foi observado no tratamento de pepinos com o extrato, onde se verificou aumentos significativos na atividade da FAL nos vegetais tratados com o extrato e inoculados com diferentes fungos de importância econômica para a cultura (Jayaraman et al., 2011). O fucoidan, composto comumente encontrado em algas do filo Phaeophyta, ao qual pertence a espécie *A. nodosum*, é apontando como o principal composto com atividade de eliciar resposta de defesas atreladas à atividade da FAL, como demonstrado por Chandía & Matsuhira (2008). Em pós-colheita, o tratamento de morangos e pêssegos com o extrato de algas, aumentou a atividade da FAL nos frutos inoculados com os patógenos *Botrytis cinerea* e *Monillinia laxa*, respectivamente e também em frutos não tratados (Corato et al., 2017).

No tratamento pós-colheita de maçãs, o fosfito de potássio não interferiu na atividade da FAL nos frutos inoculados com o fungo *Cryptosporopsis perennans* (Spolti et al., 2015). Nascimento et al. (2016), também não observaram

diferenças significativas na atividade da FAL entre plantas de arroz tratadas com fosfito de potássio e inoculadas com *Bipolaris oryzae* e plantas não tratadas, mas também inoculadas. Contudo, no tratamento de videiras visando o controle do oomiceto *Plasmopara viticola*, agente de míldio nessas plantas, o fosfito de potássio incrementou a atividade da FAL, em relação ao controle, aos 45 e 120 dias após a poda das plantas (Pinto et al., 2012).

Fan et al. (2014) destacam que, a atividade da enzima é bastante variável em função do patossistema estudado, concentração do produto aplicada e época de aplicação do produto. Além disso, a atividade da enzima, geralmente, não é alterada quando não há agente patogênico. Isso se dá, porque, o efeito de um agente indutor não é devido a ação antimicrobiana ou a sua transformação em agentes antimicrobianos, mas sim devido a sua capacidade em sensibilizar a planta e esta ativar seus mecanismos de defesa estruturais e bioquímicos em resposta a presença de um patógeno em potencial (Pascholati & Toffano, 2007). Assim, a resistência induzida se caracteriza como um sistema latente de defesa e, essa característica de “ser latente” é benéfica para a planta uma vez que evita custos energéticos desnecessários com a proteção do vegetal quando não há patógeno presente (Kuhn & Pascholati, 2007). Aparentemente, a indução de defesa em vegetais a partir de bioestimulantes é um sistema altamente orquestrado onde, primeiramente, há indução de EROs, a exemplo do H_2O_2 (Zhao et al., 2007), e essas espécies reativas geram uma cascata de sinalizações que culminam com a indução de enzimas de defesa na planta, que inclui o aumento da atividade da FAL (Tanou et al., 2017).

Nos resultados obtidos nos ensaios aqui apresentados, tanto o extrato de algas, quanto o fosfito de potássio incrementaram a atividade da FAL nas mangas, indicando que a enzima, provavelmente, participa dos processos de defesa nesses frutos. Além disso, pode-se dizer também que, os produtos utilizados, sinalizam eficientemente para respostas de defesa envolvendo a enzima. Partindo-se da hipótese de que a ativação da FAL perpassa, primeiro por um processo de explosão oxidativa e que este, comprovadamente, aconteceu nos frutos tratados, pode-se afirmar que a resposta bioquímica de defesa em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, é um processo coordenado e que culmina com a eliciação de uma série de respostas enzimáticas. Contudo, tal hipótese precisa ser melhor averiguada a partir do acompanhamento da expressão dos genes envolvidos no processo.

3.3.2.4. Conteúdo total de fenóis nas amostras

O conteúdo total de fenóis nos frutos tratados com o extrato da alga marinha e com o fosfito de potássio, está representado nas Figuras 3.22 e 3.23, respectivamente.

No ensaio com o extrato de *A. nodosum*, todos os tratamentos utilizados, incluindo os controles ASM e o fungicida estrobilurina, apresentaram-se mais eficientes em aumentar o teor de compostos fenólicos nos frutos do que o controle negativo (concentração zero) (Figura 3.22.A). Em todos os tempos de coleta, as concentrações 0,3%, 0,5% e 1,0% do extrato foram as que mais contribuíram para o acúmulo de compostos fenólicos nos frutos, sendo superiores, inclusive, ao ASM e à estrobilurina.

Nos frutos tratados com o fosfito de potássio, aos 3 e 12 dias após a inoculação dos frutos com o fungo *C. gloeosporioides*, todos os tratamentos, incluindo os controles ASM e estrobilurina, aumentaram significativamente o conteúdo total de fenóis nas amostras, quando comparados ao controle negativo (Figuras 3.23.B e E, respectivamente). No 6º e 9º dia de análise, apenas a concentração 0,1% do fosfito não diferiu significativamente do referido controle (Figuras 3.23.C e D, respectivamente). No 3º e 9º dia, o melhor tratamento utilizado foi a concentração de 0,4% do sal, sendo esta superior também, aos controles ASM e estrobilurina (Figuras 3.23.B e D, respectivamente). No 6º e 12º dia de análise, as concentrações 0,3% e 0,4% foram as que mais levaram as mangas ao acúmulo de compostos fenólicos,

dentre os tratamentos utilizados, sendo, a concentração de 0,4%, estatisticamente, o melhor tratamento nesses tempos de análise (Figuras 3.23.C e E, respectivamente).

Tanto no ensaio em que se utilizou o extrato quanto no ensaio em que utilizou o sal de potássio, o acúmulo de compostos fenólicos esteve altamente correlacionado com a concentração de cada um dos produtos utilizados. Assim, quanto maior a concentração utilizada, maiores foram os teores de compostos fenólicos observados nas mangas.

Figura 3.22. Conteúdo total de fenóis (mg de catecol g de tecido seco⁻¹), em mangas, cultivar ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Conteúdo total de fenóis nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações do extrato de *A. Nodosum* utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 3.23. Conteúdo total de fenóis (mg de catecol g de tecido seco⁻¹), em mangas, cultivar 'Tommy Atkins', tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e, posteriormente, inoculadas com o fungo *Colletotrichum gloeosporioides*. **(A)** Conteúdo total de fenóis nas amostras ao longo dos diferentes tempos de coleta; **(B)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 3º dia após a inoculação do patógeno; **(C)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 6º dia após a inoculação do patógeno; **(D)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 9º dia após a inoculação do patógeno; **(E)** Análise de variância e análise de regressão polinomial dos tratamentos ao 12º dia após a inoculação do patógeno. Os valores percentuais representam as concentrações de fosfito de potássio utilizadas. Letras minúsculas, pertencentes a um mesmo grupo, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Os compostos fenólicos presentes ou induzíveis em plantas, apresentam-se como excelentes inibidores da presença de radicais livres e, por isso, têm alta atividade antioxidante (Gil et al., 2002). Essas moléculas são altamente reativas e excelentes doadoras de elétrons (Podsędek, 2007). Algumas pesquisas demonstraram que polifenóis, presentes em blueberries (Wilson et al., 2006), e o resveratrol presente em uvas (Gruber et al., 2007), são moléculas capazes prolongar a vida útil desses vegetais e aumentar a resistência destes à estresses bióticos.

Fan et al. (2014) atestam o potencial do extrato da alga *A. nodosum*, em aumentar o conteúdo de compostos fenólicos com propriedade antioxidante em plantas de espinafre. Lola-Luz et al. (2013) também verificou que plantas de repolho tratadas com o extrato, tiveram incrementos no conteúdo total de fenóis em até duas vezes a mais que plantas não tratadas.

O acúmulo de produtos na rota dos fenilpropanoides é tido como um evento importante na defesa das plantas (Bate et al., 1994). O aumento da quantidade de compostos fenólicos, no final da rota dos fenilpropanoides, está envolvido com a criação de uma barreira física e química contra a invasão do patógeno (Ballester et al., 2013).

Moléculas eliciadoras diversas, a exemplo dos fosfitos, já foram confirmadas como ativadoras da rota dos fenilpropanoides, muito embora, os fosfitos só estimulem as defesas do hospedeiro, após o contato com o patógeno (Jackson et al., 2000). Em mangueiras, o tratamento de ramos com o fosfito de potássio e, posterior inoculação com o fungo *Ceratocystis fimbriata*, reduziu a necrose interna da planta, causada pelo patógeno, e induziu uma série de respostas de defesa microscópicas à infecção (Araújo et al., 2015). Além disso, no trabalho, verificou-se o aumento na atividade de 10 compostos fenólicos, quando comparados ao controle, sendo eles: a catequina, a epicatequina, a epigallocatequina, o ácido gálico, a miricetina, o ácido *p*-coumárico, o ácido *p*-hidroxibenzoico, a forodizina, o ácido sinapínico e o ácido salicil-hidroxiamínico. Não se sabe ao certo o mecanismo de ação dos fosfitos nos vegetais, contudo, quando a concentração do produto é baixa, ele induz a síntese de enzimas de defesa no hospedeiro, além de fitoalexinas e compostos fenólicos. Em altas concentrações, no entanto, o fosfito age diretamente sobre o fitopatógeno, inibindo o crescimento deste (Cohen & Coffey, 1986; Smillie et al., 1989; Daniel & Guest, 2006; Eshragui-Jazi et al., 2011; Dalio et al., 2014).

Em frutas verdes, o conteúdo de compostos fenólicos constitutivos tende a ser maior, e estes vão diminuindo com o amadurecimento do órgão (Rocha et al., 2011). Nos resultados aqui apresentados, observou-se discreta redução do conteúdo total de fenóis do controle negativo ao final dos ensaios. Contudo, todos os tratamentos aplicados, incluindo os controles com o ASM e o fungicida estrobilurina, incrementaram o teor de fenóis nas mangas. Poucos trabalhos na literatura se dedicaram ao estudo do extrato de algas e dos sais de potássio, aplicados no intuito de melhorar ou manter a qualidade pós-colheita de mangas parasitadas pelo fungo *C. gloeosporioides*. Assim, os resultados aqui apresentados indicam que a resistência induzida em mangas, tanto pelo extrato quanto pelo fosfito, inclui a elevação do teor de compostos fenólicos nesses frutos o que lhes confere, maior capacidade antioxidante e resistência a estresses de natureza biótica. Esses resultados são inéditos nesse contexto.

3.4. Conclusões

Todas as concentrações dos produtos aplicadas, tanto do extrato da alga marinha *A. nodosum* quanto do fosfito de potássio, incluindo os controles com o ASM e a estrobilurina, são eficientes em reduzir a severidade da antracnose em mangas.

Tanto o extrato de *A. nodosum* quanto o fosfito de potássio, induzem resistência em mangas, uma vez que, parâmetros bioquímicos como o conteúdo total de proteínas, fenóis e a atividade das enzimas β -1,3-glucanase, quitinase, peroxidase, superóxido-dismutase, catalase, polifenoloxidase e fenilalanina amonialiase são incrementados pela aplicação de ambos os produtos, em diferentes concentrações.

De modo geral, tanto a severidade da doença quanto a intensidade da resistência induzida está atrelada ao fator “concentração aplicada”, uma vez que, quando maior a concentração utilizada, menor foi a severidade da doença, observada nos frutos e mais intensas foram as respostas bioquímicas analisadas.

A utilização do extrato de *A. nodosum* e do fosfito de potássio se configuram, dessa maneira, como alternativas ao manejo da antracnose em mangas ‘Tommy Atkins’. Adicionalmente, os dois produtos atendem às demandas atuais por alternativas sustentáveis de controle de doenças na fase de pós-colheita, enquadrando-se na necessidade do mercado, que é o controle eficiente de microrganismos patogênicos e do consumidor, que é de um produto com o mínimo de resíduo químico possível.

REFERÊNCIAS

- Abe, L. T., Mota, R. V., Lajolo, F. M., Genovese, M. I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 27(2), 394-400.
- Abeles, F. B., Biles, C. L. (1991). Characterization of peroxidases in lignifying peach fruit endocarp. **Plant Physiology**, 95(1), 269-273.
- Abkhoo, J., Sabbagh, S. K. (2016). Control of *Phytophthora melonis* damping-off, induction of defense responses, and gene expression of cucumber treated with commercial extract from *Ascophyllum nodosum*. **Journal of Applied Phycology**, 28(2), 1333-1342.
- Abreu, G. F. D., Talamini, V., Stadnik, M. J. (2008). Bioprospecting of marine seaweeds and aquatic plants for controlling the bean anthracnose. **Summa Phytopathologica**, 34(1), 78-82.
- Abubakar, A. R., Ashraf, N., Ashraf, M. (2013). Effect of plant biostimulants on fruit cracking and quality attributes of pomegranate cv. Kandhari kabuli. **Scientific Research and Essays**, 8(44), 2171-2175.
- Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. **Phytopathology**, 93(5), 579-587.
- Afek, U., Orenstein, J., Carmeli, S., Rodov, V., Joseph, M. B. (1999). Umbelliferone, a phytoalexin associated with resistance of immature Marsh grapefruit to *Penicillium digitatum*. **Phytochemistry**, 50(7), 1129-1132.
- AGROFIT. (2005). **Acibenzolar-S-methyl**. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- Alam, M. Z., Braun, G., Norrie, J., & Hodges, D. M. (2013). Effect of *Ascophyllum* extract application on plant growth, fruit yield and soil microbial communities of strawberry. **Canadian Journal of Plant Science**, 93(1), 23-36.
- Alamino, D. A., Cabral, V. B., Danner, M. A., Marchese, J. A. (2013). Induction of resistance to bitter rot in apples by the use of elicitors in the postharvest. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 48(3), 249-254.
- Alexandre, E. R., Herculano, L. M., da Silva, J. M., Oliveira, S. M. A. (2014). Fosfitos no manejo da antracnose do jiló. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 49(12), 930-938.
- Ali, N., Farrell, A., Ramsubhag, A., & Jayaraman, J. (2016). The effect of *Ascophyllum nodosum* extract on the growth, yield and fruit quality of tomato grown under tropical conditions. **Journal of Applied Phycology**, 28(2), 1353-1362.
- Alkan, N., Fluhr, R., Prusky, D. (2012). Ammonium secretion during *Colletotrichum coccodes* infection modulates salicylic and jasmonic acid pathways of ripe and unripe tomato fruit. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 25(1), 85-96.
- Anguelova-Merhar, V. S., Westhuizen, A. J., Pretorius, Z. A. (2001). β -1,3-glucanase and chitinase activities and the resistance response of wheat to leaf rust. **Journal of Phytopathology**, 149(7-8), 381-384.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55, 373-399.
- Araújo, L., Bispo, W. S., Rios, V. S., Fernandes, S. A., Rodrigues, F. A. (2015). Induction of the phenylpropanoid pathway by acibenzolar-s-methyl and potassium phosphite increases mango resistance to *Ceratocystis fimbriata* infection. **Plant Disease**, 99(4), 447-459.
- Araújo, L., Stadnik, M. J., Borsato, L. C., Valdebenito-Sanhueza, R. M. (2008). Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. **Tropical Plant Pathology**, 33(2), 148-152.

- Arora, A., Sairam, R. K., Srivastava, G. C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. **Current Science**, 1227-1238.
- Baker, C. J., Orlandi, E. W. (1995). Active oxygen in plant pathogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, 33(1), 299-321.
- Ballester, A. R., Lafuente, M. T., de Vos, R. C., Bovy, A. G., González-Candelas, L. (2013). Citrus phenylpropanoids and defence against pathogens. Part I: metabolic profiling in elicited fruits. **Food Chemistry**, 136(1), 178-185.
- Barber, M. S., Bertram, R. E., & Ride, J. P. (1989). Chitin oligosaccharides elicit lignification in wounded wheat leaves. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 34(1), 3-12.
- Barbosa, F. R., Haji, F. N. P., De Alencar, J. A., Moreira, A. N., Tavares, S. D. H., Lima, M. F., Moreira, W. A. (2000). **Monitoramento de pragas e doenças na cultura da mangueira**. Embrapa Semiárido-Documents (INFOTECA-E).
- Barkai-Golan, R. (2001). **Postharvest diseases of fruits and vegetables**: development and control. Amsterdam: Elsevier. 290 p.
- Bate, N. J., Orr, J., Ni, W., Meromi, A., Nadler-Hassar, T., Doerner, P. W., Elkind, Y. (1994). Quantitative relationship between phenylalanine ammonia-lyase levels and phenylpropanoid accumulation in transgenic tobacco identifies a rate-determining step in natural product synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 91(16), 7608-7612.
- Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P., Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. **Scientia Horticulturae**, 196, 39-48.
- Bécot, S.; Pajot, E.; Le Corre, D.; Monot, C.; Silué, D. (2000). Phytogard (K_2HPO_3) induces localized resistance in cauliflower to downy mildew of crucifers. **Crop Protection**, 19, 417-425.
- Beers, R. F., & Sizer, I. W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, 195(1), 133-140.
- Beltrame, A. B. (2010). **Interação *Phytophthora nicotianae*-porta-enxerto de citros (tangerina Sunki e citrumelo Swingle): efeito no sistema radicular, aspectos fisiológicos e bioquímico**. 2010. 137 p. Doutorado em Fitopatologia, ESALQ, Piracicaba, Brasil.
- Benato, E. A., Cia, P., Sousa, N. L. (2001). Manejo de doenças de frutas pós-colheita. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, 9, 403-440.
- Berteau, O., Mulloy, B. (2003). Sulfated fucans, fresh perspectives: structures, functions, and biological properties of sulfated fucans and an overview of enzymes active toward this class of polysaccharide. **Glycobiology**, 13(6), 29R-40R.
- Blum, L. E. B., Amarante, C. V. T. D., Dezanet, A., Lima, E. B. D., Hack Neto, P., Ávila, R. D., Siega, V. (2007). Fosfitos aplicados em pós-colheita reduzem o mofo-azul em maçãs 'Fuji' e 'Gala'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 29(2), 265-268.
- Bol, J. F., Linthorst, H. J. M., Cornelissen, B. J. C. (1990). Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. **Annual Review of Phytopathology**, 28(1), 113-138.
- Borin, R. C., Possenti, J. C., dos Santos Rey, M., Bernardi, C., Mazaro, S. M. (2017). Phosphites associated to fungicides for diseases control and sanity in corn seeds. **Applied Research & Agrotechnology**, 10(1), 83-92.
- Boudjeko, T., Omokolo, N. A., Driouch, A., Balangé, A. P. (2005). Peroxidase and pectin methylesterase activities in cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) roots upon *Pythium myriotylum* inoculation. **Journal of Phytopathology**, 153(7-8), 409-416.

- Bowler, C., Montagu, M. V., Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. **Annual Review of Plant Biology**, 43(1), 83-116.
- Brackmann, A., Giehl Hettwer, R. F., Sestari, I., Steffens André, C. (2004). Fosfitos para o controle de podridões pós-colheita em maçãs Fuji durante o armazenamento refrigerado. **Ciência Rural**, 34(4).
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1-2), 248-254.
- Bressan, D. F. (2011). **Uso dos eliciadores acibenzolar-s-metílico e harpina na indução de resistência em plantas de feijoeiro comum ao crestamento bacteriano**. 2011. 64 f. Dissertação, Mestrado em Agronomia, Universidade Federal Tecnológica do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil.
- Broekaert, W. F., Peumans, W. J. (1988). Pectic polysaccharides elicit chitinase accumulation in tobacco. **Physiologia Plantarum**, 74(4), 740-744.
- Buchner, P., Rochat, C., Wuillème, S., Boutin, J. P. (2002). Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*). **Plant Molecular Biology**, 49(2), 171-186.
- Cao, S., Yang, Z., Cai, Y., Zheng, Y. (2014). Antioxidant enzymes and fatty acid composition as related to disease resistance in postharvest loquat fruit. **Food Chemistry**, 163, 92-96.
- Carmona, M., Sautua, F., & Gally, M. (2011). Fosfitos como herramienta complementaria en el manejo integrado de las enfermedades de fin de ciclo de la soja (Phosphites as a complementary tool of integrated management of soybean late season diseases). In: **XLIV Congresso Brasileiro de Fitopatologia-Bento Gonçalves RS. Tropical Plant Pathology**, 36, 387.
- Carvalho, M. E. A. D. (2013). **Efeitos do extrato de *Ascophyllum nodosum* sobre o desenvolvimento e produção de cultivos**. 2013. 70 p. Tese, Doutorado em Produção Vegetal, Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Cavalcanti, F. R., Resende, M. L. V., Pereira, R. B., da Silveira Carvalho, C. P. (2006). Atividades de quitinase e β -1,3-glucanase após eliciação das defesas do tomateiro contra a mancha-bacteriana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 41(12), 1721-1730.
- Chandía, N. P., Matsuhiro, B. (2008). Characterization of a fucoidan from *Lessonia vadosa* (Phaeophyta) and its anticoagulant and elicitor properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, 42(3), 235-240.
- Chen, J., Mao, L., Mi, H., Lu, W., Ying, T., Luo, Z. (2016). Involvement of abscisic acid in postharvest water-deficit stress associated with the accumulation of anthocyanins in strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 111, 99-105.
- Chitarra, M. I. F. (1990). **Pós-colheita de frutos e hortaliças: Fisiologia e manuseio**. Lavras: ESAL/Faepe.
- Cia, P., Pascholati, S. F., Benato, E. A. (2007). Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: Rodrigues, F. A., Romeiro, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: Editora UFV. p. 245-280.
- Cluzet, S., Torregrosa, C., Jacquet, C., Lafitte, C., Fournier, J., Mercier, L., Dumas, B. (2004). Gene expression profiling and protection of *Medicago truncatula* against a fungal infection in response to an elicitor from green algae *Ulua* spp. **Plant, Cell & Environment**, 27(7), 917-928.
- CNA. (2016). Confederação Nacional da Agricultura e Pecuária. **Fruticultura**. Disponível em <http://www.cnabrazil.org.br/sites/default/files/sites/default/files/uploads/10_fruticultura.pdf>. Acesso em: 12 abr. 2017.

- Cohen, Y., Coffey, M. D. (1986). Systemic fungicides and the control of oomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, 24(1), 311-338.
- Colapietra, M., Alexander, A. (2006). Effect of foliar fertilization on yield and quality of table grapes. **Acta Horticulturae**, 721, 213-218.
- Corato, U., Salimbeni, R., De Pretis, A., Avella, N., Patruno, G. (2017). Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. **Postharvest Biology and Technology**, 131, 16-30.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 371-393.
- Crouch, I. J., Van Staden, J. (1992). Effect of seaweed concentrate on the establishment and yield of greenhouse tomato plants. **Journal of Applied Phycology**, 4(4), 291-296.
- Dalio, R. J., Fleischmann, F., Humez, M., Osswald, W. (2014). Phosphite protects *Fagus sylvatica* seedlings towards *Phytophthora plurivora* via local toxicity, priming and facilitation of pathogen recognition. **PLoS One**, 9(1), e87860.
- Dana, M. de las M., Pintor-Toro, J. A., Cubero, B. (2006). Transgenic tobacco plants overexpressing chitinases of fungal origin show enhanced resistance to biotic and abiotic stress agents. **Plant Physiology**, 142(2), 722-730.
- Daniel, R., Guest, D. (2006). Defence responses induced by potassium phosphonate in *Phytophthora palmivora*-challenged *Arabidopsis thaliana*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 67(3), 194-201.
- Danner, M. A., Sasso, S. A. Z., Medeiros, J. G. S., Marchese, J. A., Mazaro, S. M. (2008). Indução de resistência à podridão-parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(7), 793-799.
- Dantas, A. C. V. L., Queiroz, J. M. D. O., Vieira, E. L., Almeida, V. D. O. (2012). Effect of gibberellic acid and the biostimulant Stimulate® on the initial growth of tamarind. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34(1), 8-14.
- De Capdeville, G., Wilson, C. L., Beer, S. V., Aist, J. R. (2002). Alternative disease control agents induce resistance to blue mold in harvested 'Red Delicious' apple fruit. **Phytopathology**, 92(8), 900-908.
- Debona, D., Rodrigues, F. Á., Rios, J. A., Nascimento, K. J. T. (2012). Biochemical changes in the leaves of wheat plants infected by *Pyricularia oryzae*. **Phytopathology**, 102(12), 1121-1129.
- Dixon, D. P., Skipsey, M., Edwards, R. (2010). Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, 71(4), 338-350.
- Dixon, G. R., Walsh, U. F. (2002). Suppressing *Pythium ultimum* induced damping-off in cabbage seedlings by biostimulation with proprietary liquid seaweed extracts. In: **XXVI International Horticultural Congress: Managing Soil-Borne Pathogens: A Sound Rhizosphere to Improve Productivity**, 65, 103-106.
- Dixon, R. A., Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. **The Plant Cell**, 7(7), 1085.
- Doblin, M.S., DeMelis, L., Newbigin, E., Basic, A., Read, S.M. (2001). Pollen tubes of *Nicotiana glauca* express two genes from different β -glucan synthase families. **Plant Physiology**, 125, 2040-2052.
- Duangmal, K., Apenten, R. K. O. (1999). A comparative study of polyphenoloxidases from taro (*Colocasia esculenta*) and potato (*Solanum tuberosum* var. Romano). **Food Chemistry**, 64(3), 351-359.
- Ebrahim, S., Usha, K., Singh, B. (2011). Pathogenesis-related (PR)-proteins: Chitinase and β -1, 3-glucanase in defense mechanism against malformation in mango (*Mangifera indica* L.). **Scientia Horticulturae**, 130(4), 847-852.
- Elmer, P. A. G., Reglinski, T. (2006). Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. **Plant Pathology**, 55(2), 155-177.

- Eshraghi-Jazi, F., Nematbakhsh, M., Nasri, H., Talebi, A., Haghighi, M., Pezeshki, Z., Ashrafi, F. (2011). The protective role of endogenous nitric oxide donor (L-arginine) in cisplatin-induced nephrotoxicity: Gender related differences in rat model. **Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, 16(11), 1389.
- Fan, D., Kandasamy, S., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. (2014). Pre-harvest treatment of spinach with *Ascophyllum nodosum* extract improves post-harvest storage and quality. **Scientia Horticulturae**, 170, 70-74.
- Featonby-Smith B.C., Van Staden J. (1983). The effect of seaweed concentrate on the growth of tomato plants in nematode-infested soil. **Scientia Horticulturae**, 20, 137-146.
- Ferraz, D. M. M. (2011). **Controle da antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em pós-colheita da goiaba (*Psidium guajava*), produzida em sistema de cultivo convencional e orgânico, pela aplicação de fosfitos, hidrotérnia e cloreto de cálcio**. 2011. 103 p. Dissertação, Mestrado em Fitopatologia, Universidade de Brasília, Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. (2017). Disponível em <<http://www.frac.info/resistance-overview/mechanisms-of-fungicide-resistance>>. Acesso em 19 de mai. 2017.
- Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. **Annual Review of Plant Physiology**, 37(1), 165-186.
- Fu, Z. Q., Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. **Annual Review of Plant Biology**, 64, 839-863.
- Gadaga, S. J. C., de Abreu, M. S., Resende, M. L. V., Júnior, P. M. R. (2017). Fosfitos para o controle da antracnose em feijoeiro comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 52(1), 36-44.
- Gil, M. I., Tomás-Barberán, F. A., Hess-Pierce, B., Kader, A. A. (2002). Antioxidant capacities, phenolic compounds, carotenoids, and vitamin C contents of nectarine, peach, and plum cultivars from California. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(17), 4976-4982.
- Gruber, J. A. N., Tang, S. Y., Halliwell, B. (2007). Evidence for a trade-off between survival and fitness caused by resveratrol treatment of *Caenorhabditis elegans*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1100(1), 530-542.
- Guest, D., Grant, B. (1991). The complex action of phosphonates as antifungal agents. **Biological Reviews**, 66(2), 159-187.
- Gupta, A. S., Webb, R. P., Holaday, A. S., & Allen, R. D. (1993). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). **Plant Physiology**, 103(4), 1067-1073.
- Guzzo, S. D., Martins, E. M. F. (1996). Local and systemic induction of β -1, 3-glucanase and chitinase in coffee leaves protected against *Hemileia vastatrix* by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Phytopathology**, 144(9-10), 449-454.
- Hamel, F., Boivin, R., Tremblay, C., Bellemare, G. (1997). Structural and evolutionary relationships among chitinases of flowering plants. **Journal of Molecular Evolution**, 44(6), 614-624.
- Hammerschmidt, R., Dann, E. K. (1999). The role of phytoalexins in plant protection. **Insect-Plant Interactions and Induced Plant Defence**, 223, 175.
- Helleboid, S., Hendriks, T., Bauw, G., Inzé, D., Vasseur, J., Hilbert, J. L. (2000). Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. **Journal of Experimental Botany**, 51(348), 1189-1200.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. **Plant and Cell Physiology**, 42(5), 462-468.

- Hoagland, R. E. (1990). Biochemical responses of plants to pathogens. **Microbes and Microbial Products as Herbicides**, 5, 87-113.
- Hojo, R. H., Chalfun, N. N. J., Hojo, E. T. D., Veiga, R. D., Paglis, C. M., Lima, L. C. O. (2007). Produção e qualidade dos frutos da goiabeira 'Pedro Sato' submetida a diferentes épocas de poda. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42(3), 357-362.
- IBGE. (2015). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Resultados da Produção Agrícola Municipal**. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/000000-27422109112016210223405721.pdf>>. Acesso em: 14 mai. 2017.
- Intapruk, C., Takano, M., Shinmyo, A. (1994). Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiology**, 104(1), 285.
- Ishige, F., Mori, H., Yamazaki, K., Imaseki, H. (1993). Identification of a basic glycoprotein induced by ethylene in primary leaves of azuki bean as a cationic peroxidase. **Plant Physiology**, 101, 193-199.
- Jackson, T. J., Burgess, T., Colquhoun, I., Hardy, G. S. (2000). Action of the fungicide phosphite on *Eucalyptus marginata* inoculated with *Phytophthora cinnamomi*. **Plant Pathology**, 49(1), 147-154.
- Jayaraj, J., Wan, A., Rahman, M., Punja, Z. K. (2008). Seaweed extract reduces foliar fungal diseases on carrot. **Crop Protection**, 27(10), 1360-1366.
- Jayaraman, J., Norrie, J., Punja, Z. K. (2011). Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 353-361.
- Kader, A.A. (1992). Postharvest biology and technology: an overview. In: Kader, A.A. **Postharvest Technology of Horticultural Crops**. California: University of California. p. 15-20.
- Keen, N. T., Yoshikawa, M. (1983). β -1,3-endoglucanase from soybean releases elicitor active carbohydrates from fungus cell-walls. **Plant Physiology**, 71, 460-465.
- Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S., Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 13(9), 2361-2372.
- Klarzynski, O., Plesse, B., Joubert, J. M., Yvin, J. C., Kopp, M., Kloareg, B., Fritig, B. (2000). Linear β -1,3 glucans are elicitors of defence responses in tobacco. **Plant Physiology**, 124, 1027-1038.
- Kobayashi, A., Tai, A., Kanzaki, H., Kawazu, K. (1993). Elicitor-active oligosaccharides from algal laminaran stimulate the production of antifungal compounds in alfalfa. **Zeitschrift für Naturforschung**, 48(7-8), 575-579.
- Kombrink, E., Hahlbrock, K. (1986). Responses of cultured parsley cells to elicitors from phytopathogenic fungi. **Plant Physiology**, 81(1), 216-221.
- Kuhn, O. J., Pascholati, S. F. (2007). Custo adaptativo da resistência induzida no controle de fitopatógenos. In: Rodrigues, F. A., Romeiro, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: Editora UFV. p. 67-90.
- Kulik, M. M. (1995). The potential for using cyanobacteria (blue-green algae) and algae in the biological control of plant pathogenic bacteria and fungi. **European Journal of Plant Pathology**, 101(6), 585-599.
- Lamb, C. J., Lawton, M. A., Dron, M., Dixon, R. A. (1989). Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. **Cell**, 56(2), 215-224.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M., Cardinali, A. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. **Phytochemistry: Advances in research**, 661, 23-67.

- Lers, A., Jiang, W. B., Lomaniec, E., Aharoni, N. (1998). Proteins functionally and immunogenically related to pathogenesis-related proteins are induced during parsley leaf senescence. **Physiologia Plantarum**, 103(4), 497-502.
- Leubner-Metzger, G., Frundt, C., Vogeli-Lange, R., Meins Jr, F. (1995). Class I [beta]-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. **Plant Physiology**, 109(3), 751-759.
- Lima, R. A. Z., Abreu, C. M. P. D., Asmar, S. A., Corrêa, A. D., Santos, C. D. (2010). Embalagens e recobrimento em lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) armazenadas sob condições não controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(4), 914-921.
- Lin, C. L., Wang, C. C., Chang, S. C., Inbaraj, B. S., & Chen, B. H. (2009). Antioxidative activity of polysaccharide fractions isolated from *Lycium barbarum* Linnaeus. **International Journal of Biological Macromolecules**, 45(2), 146-151.
- Liu, H., Jiang, W., Bi, Y., Luo, Y. (2005). Postharvest BTH treatment induces resistance of peach (*Prunus persica* L. cv. Jiubao) fruit to infection by *Penicillium expansum* and enhances activity of fruit defense mechanisms. **Postharvest Biology and Technology**, 35(3), 263-269.
- Lizzi, Y., Coulomb, C., Polian, C., Coulomb, P. J., Coulomb, P. O. (1998). L'algue face au Mildiou: quel avenir? Des résultats de laboratoire très encourageants. **Phytoma-La Défense des végétaux**, (508), 29-30.
- Lola-Luz, T., Hennequart, F., Gaffney, M. (2014). Effect on yield, total phenolic, total flavonoid and total isothiocyanate content of two broccoli cultivars (*Brassica oleraceae* var italica) following the application of a commercial brown seaweed extract (*Ascophyllum nodosum*). **Agricultural and Food Science**, 23(1), 28-37.
- Luna, E., Bruce, T. J., Roberts, M. R., Flors, V., Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. **Plant Physiology**, 158(2), 844-853.
- Ma, Z., Yang, L., Yan, H., Kennedy, J. F., Meng, X. (2013). Chitosan and oligochitosan enhance the resistance of peach fruit to brown rot. **Carbohydrate Polymers**, 94(1), 272-277.
- Magbanua, Z. V., De Moraes, C. M., Brooks, T. D., Williams, W. P., Luthe, D. S. (2007). Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*? **Molecular Plant-Microbe Interactions**, 20(6), 697-706.
- Mansfield, J. W. (2000). Antimicrobial compounds and resistance. In: Slusarenko, A. J., Fraser, R. S. S., van Loon, L. C. **Mechanisms of resistance to plant diseases**. Netherlands: Springer. p. 325-370.
- Marcuzzo, L. L., Duarte, T. D. S., Rosa Neto, A. J., & Hoffmann, F. (2016). Efeito de fosfíto de potássio e de fungicidas no controle da cercosporiose (*Cercospora beticola*) da beterraba. **Summa Phytopathologica**, 42(2), 186-187.
- Margis-Pinheiro, M., Marivet, J., Burkard, G. (1994). Bean class IV chitinase gene: structure, developmental expression and induction by heat stress. **Plant Science**, 98(2), 163-173.
- Mattner, S. W., Villalta, O. N., Wite, D., Porter, I. J., & Arioli, T. (2014). In vitro suppression of *Sclerotinia minor* by a seaweed extract from *Durvillaea potatorum* and *Ascophyllum nodosum*. **Australasian Plant Disease Notes**, 9(1), 137.
- Mauch, F., Staehelin, L. A. (1989). Functional Implications of the Subcellular Localization of Ethylene-Induced Chitinase and [beta]-1,3-Glucanase in Bean Leaves. **The Plant Cell**, 1(4), 447-457.
- Maximova, S. N., Marelli, J. P., Young, A., Pishak, S., Verica, J. A., Guiltinan, M. J. (2006). Over-expression of a cacao class I chitinase gene in *Theobroma cacao* L. enhances resistance against the pathogen, *Colletotrichum gloeosporioides*. **Planta**, 224(4), 740-749.

- Mayer, A. M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochemistry**, 67(21), 2318-2331.
- Mehdy, M. C. (1994). Active oxygen species in plant defense against pathogens. **Plant Physiology**, 105(2), 467.
- Melo, L. G. L., Candido, E. K., Neto, J. R. M. C., Lins, S. R. O., Rodrigues, A. A. C., Oliveira, S. M. A. (2016). Indutores de resistência abióticos no controle da fusariose do abacaxi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 51(10), 1703-1709.
- Mercier, L., Lafitte, C., Borderies, G., Briand, X., Esquerré-Tugayé, M. T., Fournier, J. (2001). The algal polysaccharide carrageenans can act as an elicitor of plant defence. **New Phytologist**, 149(1), 43-51.
- Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. **Trends in Plant Science**, 7(9), 405-410.
- Moerschbacher, B.M., Noll, U.M., Flott, B.E., Reisener, H.J. (1988). Lignin biosynthetic enzymes in stem rust infected resistant and susceptible near-isogenic wheat lines. **Physiology and Molecular Plant Pathology**, 33, 33-46.
- Mustafa, H. S., Alawami, A. M. (2012). Susceptibility of Newly Introduced Potato Cultivars to Libya to Infection with Bacterial Soft Rot and the Associated Physiological Changes. **Journal of Agricultural Science and Technology**, 2(8A), 976.
- Nascimento, A. R., Fernandes, P. M., Rocha, M. R., SILVA, E. A. (2008). Fontes de fosfito e acibenzolar-s-metil no controle de doenças e produtividade do tomateiro. **Bioscience Journal**, 24(1), 53-59.
- Nascimento, K. J. T., Araujo, L., Resende, R. S., Schurt, D. A., Silva, W. L. D., Rodrigues, F. A. (2016). Silicon, acibenzolar-S-methyl and potassium phosphite in the control of brown spot in rice. **Bragantia**, 75(2), 212-221.
- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. **Annual Review of Phytopathology**, 30(1), 369-389.
- O'Sullivan, L., Jiwan, M. A., Daly, T., O'Brien, N. M., Aherne, S. A. (2010). Bioaccessibility, uptake, and transport of carotenoids from peppers (*Capsicum* spp.) using the coupled in vitro digestion and human intestinal Caco-2 cell model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(9), 5374-5379.
- Oliari, I. C. R., Barcelos, R. A., Fedrigo, K., Garcia, C., Marchi, T., Botelho, R. V. (2014). Extrato de alga no controle *in vitro* de *Monilinia fructicola*. **Cadernos de Agroecologia**, 9(1).
- Oliveira, E. S. D., Viana, F. M. P., Martins, M. V. V. (2016). Alternatives to fungicides in the control of banana anthracnose. **Summa Phytopathologica**, 42(4), 340-350.
- Pascholati, S. F., Melo, T. A., Brand, S. C., Rezende, D. C., Nogueira Júnior, A. F., Silva Júnior, M. B., Resende, M. L. V. (2014). Indução de resistência no controle de fitopatógenos: registro de indutores e uso comercial no Brasil. In: Schwan-Estrada, K. R. F., da Silva, C. M., Maia, A. J., Colella, J. C. T. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Maringá: UEM/MPA. p. 233-254.
- Pascholati, S. F., Souza, V. H. M. Indução de resistência como estratégia no manejo de doenças de plantas. In: Goes, A., Pereira, F. D., Poloni, N. M. **Tópicos Especiais em Fitopatologia Aplicada**. Jaboticabal: Funep. P. 23-32.
- Pascholati, S. F., Toffano, L. (2007). Indução de resistência contra fitopatógenos em espécies arbóreas. In: Rodrigues, F. A., Romeiro, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: Editora UFV. p. 59-66.
- Peres, J. C. F., Carvalho, L. R. D., Gonzalez, E., Berian, L. O. S., Felicio, J. D. (2012). Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciência e Agrotecnologia**, 36(3), 294-299.

- Perumal, A. B., Sellamuthu, P. S., Nambiar, R. B., & Sadiku, E. R. (2017). Effects of essential oil vapour treatment on the postharvest disease control and different defence responses in two mango (*Mangifera indica* L.) cultivars. **Food and Bioprocess Technology**, 10(6), 1131-1141.
- Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, 28, 489-521.
- Pieterse, C. M., Zamioudis, C., Berendsen, R. L., Weller, D. M., Van Wees, S. C., Bakker, P. A. (2014). Induced systemic resistance by beneficial microbes. **Annual Review of Phytopathology**, 52, 347-375.
- Pinho, D. B., Mizobutsi, E. H., Silva, S. O., Reis, S. T., Mizobutsi, G. P., Xavier, A. A., Maia, V. M. (2010). Avaliação de genótipos de bananeira à *Colletotrichum musae* em pós-colheita. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 32(3), 786-790.
- Pinto, K. M. S., Nascimento, L. C., Gomes, E. C. S., Silva, H. F., Miranda, J. R. (2012). Efficiency of resistance elicitors in the management of grapevine downy mildew *Plasmopara viticola*: epidemiological, biochemical and economic aspects. **European Journal of Plant Pathology**, 134(4), 745-754.
- Ploetz, R. C. (1994). **Compendium of tropical fruit diseases**. Disponível em <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19950100174>>. Acesso em: 12 jun. 2017.
- Podsiadek, A. (2007). Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Science and Technology**, 40(1), 1-11.
- Ponstein, A. S., Bres-Vloemans, S. A., Sela-Buurlage, M. B., van den Elzen, P. J., Melchers, L. S., Cornelissen, B. J. (1994). A novel pathogen and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity. **Plant Physiology**, 104(1), 109-118.
- Poole, C. F., Poole, S. K., Abraham, M. H. (1998). Recommendations for the determination of selectivity in micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography**, 798(1), 207-222.
- Prusky, D. (1996). Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, 34(1), 413-434.
- Ramamoorthy, V., Raguchander, T., Samiyappan, R. (2002). Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorescens* Pf1 and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **Plant and Soil**, 239(1), 55-68.
- Reetz, E. R., Kist, B. B., Carvalho, C., Drum, M. (2015). **Anuário Brasileiro da Fruticultura**. Santa Cruz do Sul: Editora Gazeta. 104 p.
- Regasini, L. O., Fernandes, D. C., Castro-Gamboa, I., Silva, D. H. S., Furlan, M., Bolzani, V. D. S., Velloso, J. C. R. (2008). Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**, 802-806.
- Renard-Merlier, D., Randoux, B., Nowak, E., Farcy, F., Durand, R., Reignault, P. (2007). Iodine 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. **Phytochemistry**, 68(8), 1156-1164.
- Reuveni, M., Sheglov, D., Cohen, Y. (2003). Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**, 87(8), 933-936.
- Ribeiro Júnior, P. M., Resende, M. L. V., Pereira, R. B., Cavalcanti, F. R., Amaral, D. R., Pádua, M. A. (2006). Fosfito de potássio na indução de resistência a *Verticillium dahliae* Kleb., em mudas de cacaueteiro (*Theobroma cacao* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, 30(4), 629-636.
- Ribeiro, J. G., Serra, I. M. R. S., Araújo, M. U. P. (2016). Use of natural products to control anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in papaya. **Summa Phytopathologica**, 42(2), 160-164.

- Robinson, S. P., Jacobs, A. K., Dry, I. B. (1997). A class IV chitinase is highly expressed in grape berries during ripening. **Plant Physiology**, 114(3), 771-778.
- Rocha, W. S., Lopes, R. M., Silva, D. D., Vieira, R. F., Silva, J. D., Agostini-Costa, T. D. S. (2011). Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(4), 1215-1221.
- Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F. M., Smilanick, J. L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. **Postharvest Biology and Technology**, 63(1), 141-147.
- Romanazzi, G., Sanzani, S. M., Bi, Y., Tian, S., Martínez, P. G., Alkan, N. (2016). Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, 122, 82-94.
- Roncatto, M. C., Pascholati, S. F. (1998). Change in activity and electrophoretic pattern of peroxidase in maize (*Zea mays*) and sorghum (*Sorghum bicolor*) leaves after treatment with yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). **Scientia Agricola**, 55(3), 395-402.
- Ryan, C. A., Farmer, E. E. (1991). Oligosaccharide signals in plants: a current assessment. **Annual Review of Plant Biology**, 42(1), 651-674.
- Sales Júnior, R., Costa, F. M., Marinho, R. E. M., Nunes, G. H. S., Amaro Filho, J., Miranda, V. S. (2004) Utilização de azoxistrobina no controle da antracnose da mangueira. **Fitopatologia Brasileira**, 29(2), 193-196.
- Sangha, J. S., Ravichandran, S., Prithiviraj, K., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. (2010). Sulfated macroalgal polysaccharides λ -carrageenan and ι -carrageenan differentially alter *Arabidopsis thaliana* resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 75(1), 38-45.
- Santos, A. W., Steiner, N., Guerra, M. P., Zoglauer, K., Moerschbacher, B. M. (2008). Somatic embryogenesis in *Arancaria angustifolia*. **Biologia Plantarum**, 52(1), 195-199.
- Sautter, C. K., Storck, L., Rizzatti, M. R., Mallmann, C. A., Brackmann, A. (2008). Síntese de *trans*-resveratrol e controle de podridão em maçãs com uso de elicitores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 43(9), 1097-1103.
- Scandalios Filha, M. X., Rodrigues, F. A., Domiciano, G. P., Oliveira, H. V., Silveira, P. R., Moreira, W. R. (2011). Wheat resistance to leaf blast mediated by silicon. **Australasian Plant Pathology**, 40(1), 28-38.
- Schlumberg, A., Mauch, F., Vögeli, U., Boller, T. (1986). Plant chitinases are potent inhibitors of fungal growth. **Nature**, 324(6095), 365-367.
- Schwan-Estrada, K. R. F., Stangarlin, J. R., Pascholati, S. F. (2008). Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: Pascholati, S. F., Leite, B., Stangarlin, J. R., Cia, P. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular**. Piracicaba: FEALQ. p. 227-248.
- Shu, M. H., Appleton, D., Zandi, K., AbuBakar, S. (2013). Anti-inflammatory, gastroprotective and anti-ulcerogenic effects of red algae *Gracilaria changii* (Gracilariales, Rhodophyta) extract. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 13(1), 61.
- Silva, J. F., Pinheiro, R. F., Amaro, A. L., Pereira, M. J., Roriz, M., Aguiar, A., Carvalho, S. M. (2014). Otimização da aplicação de um bio-estimulante para o aumento da produtividade e qualidade do morango. **Actas Portuguesas de Horticultura**, 23, 380-388.
- Singh, U. P., Pandey, V. B., Singh, K. N., Singh, R. D. N. (1988). Antifungal activity of some new flavones and flavone glycosides of *Echinops echinatus*. **Canadian Journal of Botany**, 66(9), 1901-1903.

- Smillie, R., Grant, B. R., Guest, D. (1989). The mode of action of phosphite: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. **Phytopathology**, 79(9), 921-926.
- Sousa, T. Y. O. (2017). **Indução de resistência aplicada ao manejo da antracnose em goiabas na pós-colheita**. 2017. 41 p. Monografia, Agronomia, Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, Brasil.
- Souza, M. L. D., Morgado, C. M. A., Marques, K. M., Mattiuz, C. F. M., Mattiuz, B. H. (2011). Pós-colheita de mangas "Tommy Atkins" recobertas com quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 337-343.
- Spolti, P., Valdebenito-Sanhueza, R. M., Campos, Â. D., Del Ponte, E. M. (2015). Modo de ação de fosfitos de potássio no controle da podridão olho de boi em maçã. **Summa Phytopathologica**, 41, 42-48.
- Stadnik, M. J., Freitas, M. B. Polissacarídeos algais: fonte de indutores de resistência em plantas. In: Rodrigues, F. A., Fortunato, A. A., Resende, R. S. **Indução de resistência em plantas a patógenos**. Viçosa, MG: Editora UFV. p. 29-50.
- Stadnik, M. J., Paulert, R. (2008). Uso de macroalgas marinhas na agricultura. In: **Congresso Brasileiro de Ficologia, Itajaí, SC. XI Congresso Brasileiro de Ficologia/Simpósio Latino-americano sobre algas nocivas**. Rio de Janeiro, RJ. Museu Nacional do Rio de Janeiro (Vol. 30, p. 267-279).
- Stevens, D. R., Purton, S. (1997). Genetic engineering of eukaryotic algae: progress and prospects. **Journal of Phycology**, 33(5), 713-722.
- Stoessl, A., Bailey, J. A., Daverall, B. J. (1983). Secondary plant metabolites in preinfectious and postinfectious resistance. **The Dynamics of Host Defense**, 71-122.
- Subramanian, S., Sangha, J. S., Gray, B. A., Singh, R. P., Hiltz, D., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. (2011). Extracts of the marine brown macroalga, *Ascophyllum nodosum*, induce jasmonic acid dependent systemic resistance in *Arabidopsis thaliana* against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 and *Sclerotinia sclerotiorum*. **European Journal of Plant Pathology**, 131(2), 237-248.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2012). **Plant Physiology**. Sunderland: Sinauer Associates Inc. Publishers. 690 p.
- Tanou, G., Ziogas, V., & Molassiotis, A. (2017). Foliar nutrition, biostimulants and prime-like dynamics in fruit tree physiology: new insights on an old topic. **Frontiers in Plant Science**, 8, 75.
- Tavares, G. M., Laranjeira, D., Luz, E. D. M. N., Silva, T. R., Pirovani, C. P., Resende, M. L. V., Júnior, P. M. R. (2010). Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 44(11), 1416-1423.
- Taylor, W. R. (1957). **The Marine Algae of the Northeast Coast of North America**. Michigan: Literary Licensing. 509 p.
- Terao, D., Oliveira, S., Tavares, S. D. H., Laranjeira, D. (2001). Efecto de la nutrición sobre el desarrollo vegetativo y reproductivo del agente de la malformación floral y vegetativa del mango. **Boletín Micológico**, 16.
- Terao, D., Batista, D.C., Ribeiro, I. J. A. (2016). Doenças da Mangueira. In: Amorim, L., Rezende, J. A. M., Bergamin Filho, A., Camargo, L. E. A. **Manual de Fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 5. ed. vol. 2. São Paulo: Agrômica Ceres. p. 523-534.
- Terry, L. A., Joyce, D. C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, 32(1), 1-13.
- Treichel, M., Kist, B. B., Santos, C. E., Carvalho, C., Beling, R. R. (2016). **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2016**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul. 88 p.
- Toledo, G. L., Ovalle, I. I. (2008). **Estatística Básica**. 2. ed. São Paulo: Atlas. 459 p.

- Ugarte, R. A., Sharp, G., Moore, B. (2006). **Changes in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jol. plant morphology and biomass produced by cutter rake harvests in southern New Brunswick, Canada.** In: Eighteenth International Seaweed Symposium. Springer, Netherlands. p. 125-133.
- Umesha, S. (2006). Note: Phenylalanine ammonia lyase activity in tomato seedlings and its relationship to bacterial canker disease resistance. **Phytoparasitica**, 34(1), 68-71.
- Vander, P., Vårum, K. M., Domard, A., El Gueddari, N. E., & Moerschbacher, B. M. (1998). Comparison of the ability of partially N-acetylated chitosans and chitoooligosaccharides to elicit resistance reactions in wheat leaves. **Plant Physiology**, 118(4), 1353-1359.
- Vera, J., Castro, J., Gonzalez, A., Moenne, A. (2011). Seaweed polysaccharides and derived oligosaccharides stimulate defense responses and protection against pathogens in plants. **Marine Drugs**, 9(12), 2514-2525.
- Vidhyasekaran, P. (1997). **Fungal pathogenesis in plants and crops: molecular biology and host defense mechanisms.** Marcel Decker, New York.
- Walters, D. R., Ratsep, J., Havis, N. D. (2013). Controlling crop diseases using induced resistance: challenges for the future. **Journal of Experimental Botany**, 64(5), 1263-1280.
- Walters, D., Walsh, D., Newton, A., Lyon, G. (2005). Induced resistance for plant disease control: maximizing the efficacy of resistance elicitors. **Phytopathology**, 95(12), 1368-1373.
- Wilson, M. A., Shukitt-Hale, B., Kalt, W., Ingram, D. K., Joseph, J. A., Wolkow, C. A. (2006). Blueberry polyphenols increase lifespan and thermotolerance in *Caenorhabditis elegans*. **Aging Cell**, 5(1), 59-68.
- Wu, C. T., Bradford, K. J. (2003). Class I chitinase and β -1, 3-glucanase are differentially regulated by wounding, methyl jasmonate, ethylene, and gibberellin in tomato seeds and leaves. **Plant Physiology**, 133(1), 263-273.
- Xiang, L., Moore, B. S. Inactivation, complementation, and heterologous expression of *enp*, a novel bacterial phenylalanine ammonia-lyase gene. **Journal of Biological Chemistry**, 277(36): 32505-32509.
- Yoruk, R., Marshall, M. R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: a review. **Journal of Food Biochemistry**, 27(5), 361-422.
- Zeyen, R. J., Bushnell, W. R., Carver, T. L. W., Robbins, M. P., Clark, T. A., Boyles, D. A., Vance, C. P. (1995). Inhibiting phenylalanine ammonia lyase and cinnamyl-alcohol dehydrogenase suppresses Mla1 (HR) but not mlo5 (non-HR) barley powdery mildew resistances. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, 47(2), 119-140.
- Zhao, M. G., Tian, Q. Y., Zhang, W. H. (2007). Nitric oxide synthase-dependent nitric oxide production is associated with salt tolerance in Arabidopsis. **Plant Physiology**, 144(1), 206-217.
- Zodape, S. T., Gupta, A., Bhandari, S. C., Rawat, U. S., Chaudhary, D. R., Eswaran, K., Chikara, J. (2011). Foliar application of seaweed sap as biostimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). **NISCAIR-CSIR**, 70(3), 215-219.

4. EFEITO DO EXTRATO DA ALGA MARINHA *Ascophyllum nodosum* E DO FOSFITO DE POTÁSSIO SOBRE CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DE MANGAS 'TOMMY ATKINS' NA PÓS-COLHEITA

Resumo

A manutenção da qualidade fisiológica de mangas é requerida em várias etapas da cadeia produtiva desses vegetais. Esta pode ser alcançada por diversas variáveis que vão, desde o controle da temperatura e da concentração de gases, até o tratamento de frutos com produtos que asseguram essa qualidade. Alguns trabalhos já atestaram o potencial de determinadas substâncias e produtos, disponíveis comercialmente, aplicados para a melhoria da qualidade fisiológica de mangas. Muitos outros produtos estão disponíveis, contudo, poucos foram estudados. Além disso, a maioria das pesquisas não visam a vida pós-colheita dos vegetais. Esse é o caso do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* e do fosfito de potássio, dois produtos disponíveis comercialmente, amplamente utilizados na agricultura para as mais variadas finalidades e com potencial comprovado na manutenção e melhoria da qualidade fisiológica de plantas e partes destas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato da alga marinha *A. nodosum* (Acadian®) e do fosfito de potássio (Phytogard®), ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre características físicas e químicas de mangas 'Tommy Atkins', na fase de pós-colheita. Para isso, foram preparadas cinco concentrações do extrato comercial de *A. nodosum*, o Acadian®, e cinco concentrações do fosfito de potássio (Phytogard®), em água, sendo: 0, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% e 0, 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%, respectivamente. Os tratamentos foram aplicados a partir da imersão das mangas, em cada uma das concentrações, por 5 min. Após tratados, os frutos foram armazenados à 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h e 75±5% de UR, por 12 dias. A cada 3 dias as análises foram realizadas, totalizando 4 análises ao longo do tempo de armazenamento. Os parâmetros físicos analisados foram: a massa fresca total dos frutos, expressa em porcentagem de massa fresca perdida ao longo do período de armazenamento; a coloração da polpa (ângulo Hue) e; a firmeza da polpa. Os parâmetros químicos analisados foram: a acidez da polpa e a acidez total titulável nas parcelas; o conteúdo de sólidos solúveis e; o total de carboidratos nas cascas dos frutos. Os resultados evidenciaram que tanto o extrato de algas quanto o sal de potássio, em todas as concentrações utilizadas, ajudaram na redução da perda de massa dos frutos, retardaram a diminuição do ângulo de cor da polpa (ângulo Hue) e a firmeza desta. Além disso, os produtos testados desaceleraram a perda de acidez da polpa e mantiveram elevados os valores de ácidos orgânicos, a exemplo do ácido cítrico; mantiveram abaixo do tratamento controle o conteúdo de sólidos solúveis (°Brix), mas não interferiram no total de carboidratos encontrados nas cascas dos frutos. O tempo de armazenamento interfere diretamente nos parâmetros físicos e químicos de mangas. De modo geral, o extrato de *A. nodosum* e o fosfito de potássio, retardam o amadurecimento e senescência de mangas na fase de pós-colheita e, portanto, configuram-se como alternativas promissoras na manutenção da qualidade fisiológica desses frutos.

Palavras-chave: Qualidade fisiológica; *Mangifera indica*; Acadian®; Phytogard®

Abstract

Maintenance of the physiological quality of mangoes is required at various stages of the productive chain of these fruits. This can be achieved by handling variables ranging from the control of temperature and gas concentration to the treatment of fruits with products that ensure this quality. Some work has already shown the potential of certain commercially available substances and products applied to improve the physiological quality of mangoes. Many other products are available; however, few have been studied. In addition, most of the research does not address the post-harvest life of vegetables. This is the case of *Ascophyllum nodosum* seaweed extract and potassium phosphite, two commercially available products widely used in agriculture for a wide variety of purposes and with proven potential in maintaining and improving the physiological quality of plants and parts thereof. Thus, the objective of this work was to verify the effect of *A. nodosum* seaweed extract (Acadian®) and potassium phosphite (Phytogard®), both applied in different concentrations, on the physical and chemical characteristics of 'Tommy Atkins' mangoes, in the postharvest phase. Thus, five concentrations of *A. nodosum* commercial extract, Acadian®, and five concentrations of potassium phosphite (Phytogard®) were prepared in water: 0, 0.1%, 0.3%, 0.5% and 1.0% and 0, 0.1%, 0.2%, 0.3% and 0.4%, respectively. The treatments were applied by immersing the mangoes at each concentration for 5 min. After treatment, the fruits were stored at 25±2 °C, 12 h photoperiod and 75±5% RH, for 12 days. Every 3 days the analyzes were performed, totalizing 4 analyzes along the storage time. The physical parameters analyzed were the total fresh mass of the fruits, expressed as percentage of fresh lost mass during the storage period, the coloring of the pulp (Hue angle) and the firmness of the pulp. The chemical parameters analyzed were the acidity and the titratable total acidity

of the pulps, the content of soluble solids and the total of carbohydrates in the fruit peels. The results showed that both the algae extract and the potassium salt, in all the concentrations used, helped to reduce the mass loss of the fruits, delayed the decrease of the color angle of the pulp (Hue angle) and the firmness of it. In addition, the products tested decelerated the acidity loss of the pulp and maintained high values of organic acids, as citric acid, and maintained below of the control the content of soluble solids in treated fruits ($^{\circ}$ Brix), but did not interfere in the total carbohydrate found in the fruit peels. The storage time directly interferes with the physical and chemical parameters of mangoes. In general, *A. nodosum* seaweed extract and potassium phosphite, delay maturation and senescence of mangoes in the postharvest phase and, therefore, both constitute promising alternatives in maintaining the physiological quality of these fruits.

Keywords: Physiological quality; *Mangifera indica*; Acadian®; Phytogard®

4.1. Introdução

A manga (*Mangifera indica* L.) é uma das frutas mais consumidas em todo mundo devido a sua delicadeza, sabor e valor nutricional. É um fruto pertencente à família *Anacardiaceae* (Bompard, 2009) e se destaca por ser a segunda fruta tropical mais importante na fruticultura industrial em todo o mundo (Singh et al., 2013). As mangueiras são árvores sempre verdes e florescem em condições de clima tropical e subtropical, gerando frutos 4-6 anos após o plantio, dependendo do modo de propagação. As mangas são frutos do tipo drupa, classificados como deliquescentes, contendo uma única semente mono ou poliembriônica, rodeada por um mesocarpo pulposo e fresco (polpa comestível) e recoberto por um exocarpo (pele coriácea) (Zaharah et al., 2013). Há grande variação com relação ao peso de cada fruto, forma e coloração entre as cultivares plantadas. Com relação à maturação, os frutos alcançam esse estágio fenológico entre 11 e 14 semanas após a formação completa da drupa. Esse tempo de maturação é variável por conta do cultivar e também, das condições de cultivo (Lizada, 1993). As mangas são frutos climatéricos e, por isso, amadurecem rapidamente sob condições ambientais normais de temperatura (25 °C), mesmo se colhidos muito verdes. Durante o amadurecimento, acontecem várias transformações bioquímicas no fruto que incluem o aumento da respiração e da produção do hormônio etileno; mudanças nos níveis endógenos do ácido abscísico e do ácido idol-3-acético; amolecimento do fruto; mudança nos níveis de carboidratos na polpa, ácidos orgânicos, compostos fenólicos e pH; produção de compostos fenólicos voláteis, de aroma bastante característico, assim como, mudança na coloração da polpa de um amarelo claro para um amarelo bem intenso e amolecimento dos frutos (Gomes-Lim, 1997; Singh et al., 2012).

A polpa da manga é fibrosa e contém aminoácidos, carboidratos, ácidos-graxos, minerais, ácidos orgânicos, proteínas, vitaminas e polifenóis. A composição da polpa nos frutos varia em função do cultivar, localização no fruto, estágio de colheita e amadurecimento, condições e tempo de armazenamento. Embora a polpa seja uma fonte rica em β -carotenos em arranjos *cis* e *trans*, a forma *trans* predomina e tem maior atividade biológica em termos de pró-vitamina A. O conteúdo de carotenoides nos cultivares indianos maduros, varia de 0,38 a 1,20 mg 100 g⁻¹ de polpa (Kalra et al., 1994). Frutos maduros são ricos em vitaminas A, B1, B2 e apresentam níveis moderados de vitamina C (Mukherjee, 1997). A sacarose é o açúcar predominante em frutos maduros, seguido da frutose e da glicose. Vários ácidos orgânicos conferem acidez ao fruto. Os ácidos cítrico e málico são os predominantes, seguidos, em menores concentrações, pelos ácidos tartárico, oxálico e α -cetoglutárico (Singh et al., 2012). A polpa também apresenta, níveis significativos de compostos polifenólicos, tais como ácidos gálicos (ácidos *m*-digálico e *m*-trigálico), galotaninos, quercetinas, isoquercetinas, mangiferinas, ácido elágico e β -glucogalina (Schieber et al., 2000; Masibo & He, 2009). O ácido gálico é o principal polifenol presente em mangas, seguido por seis taninos hidrolisáveis e quatro compostos em menores quantidades, tais como o ácido *p*-hidroxibenzóico, o ácido *m*-coumárico e *p*-coumárico e o ácido fulérico (Kim et al.,

2007). Dentro os compostos bioativos, os polifenóis oferecem à saúde humana benefícios que incluem, a proteção contra doenças cardiovasculares e câncer devido ao potencial antioxidante que eles apresentam (Joshapura et al., 2001). As mangas são fontes ricas em um triterpeno chamado lupeol ($1,80 \mu\text{g g}^{-1}$ de polpa), o qual tem potencial antimicrobiano, anti-inflamatório, anti-helmíntico, antiangiogênico, sendo também, considerado um agente com potencial na diminuição do mau colesterol (Siddique & Saleem, 2011).

A mangueira é uma planta originária da região Nordeste da Índia e Norte de Myanmar, sendo encontrada também, nas encostas montanhosas do Himalaia (Mukherjee, 1953). Os maiores centros produtores da fruta estão localizados nas regiões secas e úmidas do subcontinente indiano, Sudeste asiático, Américas Central e do Sul e em outras áreas distante dos trópicos como na Austrália, Israel, Espanha e Califórnia, nos EUA (Crane et al., 1997). Segundos dados da FAO (2012), mangueiras estão crescendo em, aproximadamente, 5,1 milhões de ha em 94 países do mundo. As maiores áreas de produção da fruta estão localizadas na Índia, seguida pela China, Tailândia, Filipinas e México. A produção anual de manga é de 35,9 milhões de toneladas que geram uma receita de 2,15 bilhões de dólares, considerando apenas os 20 maiores produtores mundiais da fruta (Treichel et al., 2016). A Índia aparece em primeiro lugar na produção mundial de mangas, contribuindo com 45,5% do total produzido, seguida pela China (12,1%), Tailândia (7,1%), Paquistão (4,96%), México (4,46%), Indonésia (3,65%) e Brasil (3,31%) (FAO, 2012).

Apenas três países respondem por 50% da oferta mundial de frutas frescas. Estima-se que no mundo sejam produzidas cerca de 800 milhões de toneladas de frutas, em área de, aproximadamente, 61,4 milhões de ha. Esses resultados são do ano de 2012, o último dado divulgado pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO). A participação da China, Índia e Brasil foi de 227,5 milhões de toneladas, 72,5 milhões de toneladas e 41 milhões de toneladas, respectivamente. A soma do volume do quarto ao décimo maior produtor de frutas, representou 17,5% do total produzido. As posições eram ocupadas, pela ordem, pelos Estados Unidos, Turquia, Indonésia, México, Irã, Filipinas e Espanha. Em média, 90% das frutas colhidas no mundo, são consumidas no país de origem. Apenas 10% do total é negociado no mercado internacional. Isso representa oportunidade para a fruticultura brasileira que produz grande variedade de espécies, podendo conquistar mercados, tanto para as mais consumidas, aqui se inclui a manga, quanto em nichos especiais (Singh et al., 2013; Treichel et al., 2016).

Para que se garanta o crescimento desse mercado, é necessário que os produtores tenham em mente as épocas adequadas para a produção e futura comercialização, além das técnicas de correto manejo dos frutos, visando, com isso, a qualidade que atenda aos padrões internacionais de exportações e a minimização de perdas. No que se refere às perdas, Lima et al. (2010) elencaram os oito frutos com maiores índices de perdas no Brasil, na fase de pós-colheita, e a manga aparece em quinto lugar. Esses prejuízos são resultantes de infecções advindas do campo, pragas e locais inadequados para o armazenamento do fruto, além da aplicação de produtos que interferem na fisiologia desses órgãos.

Alguns trabalhos já atestaram o potencial de determinadas substâncias e produtos disponíveis comercialmente, na proteção de mangas e melhoria da qualidade fisiológica destas (Amariz et al., 2010; Plotto et al., 2010; Souza et al., 2011). Muitos outros produtos estão disponíveis, contudo, poucos foram estudados. Além disso, a maioria das pesquisas não visam a vida pós-colheita dos vegetais. Esse é o caso do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (L.) Le Jolis, o qual tem sido amplamente utilizado, para os mais variados fins dentro da agricultura, e tem apresentado excelentes respostas. O extrato dessa alga é distribuído por inúmeras empresas no mundo (Khan et al., 2009) e os produtos diferem entre si em função da forma de preparação e demais aditivos inseridos nas formulações. O Acadian®, produzido pela Acadian Seaplants do Canadá, apresenta em sua constituição 5,3% de K_2O e 6,0% de carbono orgânico total. É um extrato líquido, viscoso de coloração preta. Apresenta um odor característico de algas

marinhas e pH que varia de 7,8 a 8,2. De acordo com testes já realizados, o extrato é um bom promotor do crescimento vegetal e nutridor de plantas (Carvalho, 2013), acelera a germinação de sementes e favorece o estabelecimento de plântulas (Jayraman et al., 2011), aumenta a resistência da planta tratada à estresses bióticos e abióticos (Khan et al., 2009) e ativa mecanismos de resistência em plantas (Craigie, 2011).

Outro produto amplamente utilizado na agricultura, é o fosfito de potássio (Terry & Joyce, 2004; Machinandiarena et al., 2012; Cerioni et al., 2013; Lai et al., 2017). Os fosfitos são compostos originados da neutralização do ácido fosforoso (H_3PO_3), por uma base que, sendo esta o hidróxido de potássio, forma o fosfito de potássio (Reuveni, 1997) e, até o momento, não se definiu o exato modo de ação destas moléculas (Frac, 2017). No Brasil, o fosfito de potássio é registrado e vendido como fertilizante foliar, mas, nos Estados Unidos dois produtos à base da molécula, o KPhos® e o Fungi-Phite®, foram registrados como fungicidas, sendo indicados para o manejo de doenças na pós-colheita de frutas (Cieroni et al., 2013; Dambros & Rocha, 2016). O Phytogard® é um exemplo de produto à base de fosfito de potássio disponível no Brasil, sendo produzido pela Stoller do Brasil LTDA. Esse produto possui 28% de P_2O_5 , cuja fonte é o ácido fosforoso, e 26% de K_2O , com densidade de $1,51 \text{ g L}^{-1}$, pH 7,0. Na literatura, vários trabalhos confirmam o potencial do fosfito de potássio no controle de doenças (Amiri & Bompeix, 2011; Machinandiarena et al., 2012; Amaral et al., 2017) e os efeitos da molécula sobre a maturação dos frutos (Grech, 2017) e qualidade fisiológica de vegetais diversos (Pelá et al., 2010; Bourscheidt, 2012; Vasquez et al., 2014).

É crescente no Brasil o mercado de produtos agrícolas manejados com biomoléculas que apresentam propriedades antimicrobianas e que elevam a segurança alimentar, esta última, tanto na perspectiva de um produto livre de resíduos químicos quanto na perspectiva social, atrelada à certeza de uma alimentação futura pela manutenção dos níveis de produção dos diferentes sistemas de cultivo. Se essas moléculas forem capazes de aumentar a vida útil de frutos sem comprometer o ambiente e, especialmente, o homem, estas certamente alcançarão nichos de mercado, gerando, com isso, uma cadeia de benefícios que vem desde o produtor, passa pelo distribuidor e chega ao consumidor. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o efeito do extrato da alga marinha *Ascophyllum nodosum* (Acadian®) e do fosfito de potássio (Phytogard®), ambos aplicados em diferentes concentrações, sobre características físicas e químicas de mangas ‘Tommy Atkins’, na fase de pós-colheita.

4.2. Material E Métodos

Parte deste trabalho foi desenvolvida no Laboratório de Pós-Colheita da Universidade Estadual do Maranhão, UEMA, em São Luís, MA e parte, no Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Fitopatológica da ESALQ/USP, em Piracicaba, SP. Dessa forma, foram executadas análises para avaliar características físicas e químicas dos frutos tratados, conforme descrito abaixo.

4.2.1. Análises físicas

As mangas, variedade 'Tommy Atkins', foram adquiridas na Central de Abastecimento do município de São Luís, CEASA e escolhidas, visualmente, aquelas que apresentaram padronização quanto ao tamanho, estágio fisiológico de maturação e coloração da casca.

Após, as mangas foram levadas para o Laboratório de Pós-Colheita da UEMA, sendo os pedúnculos dos frutos padronizados para 20 mm de comprimento. Após, as mangas foram lavadas com detergente neutro e água potável, higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 0,05%, lavadas mais uma vez em água potável, colocadas para secar no ambiente e separadas em badeiras forradas com tripla camada de papel de filtro, sendo, em cada bandeja, depositados dois frutos.

Foram preparadas cinco concentrações do extrato comercial de *A. nodosum* (Acadian®), e cinco concentrações do fosfito de potássio (Phytogard®), em água, sendo: 0, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% v/v e 0, 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4% v/v, respectivamente. Além disso, às diferentes concentrações preparadas foi adicionado 0,05% de Tween 20®. Os tratamentos foram aplicados a partir da imersão das mangas, em cada uma das concentrações, por 5 min. Após tratados, os frutos foram armazenados à 25±2 °C, fotoperíodo de 12 h e 75±5% de UR, por 12 dias.

A cada 3 dias as análises foram realizadas, totalizando 4 análises ao final de 12 dias, e elas consistiram de:

- Massa fresca total dos frutos, mensurada com o auxílio de uma balança digital com capacidade máxima de 2.000 g, precisão de 0,1 g e expressa em porcentagem de massa fresca percentual perdida;
- A coloração da polpa, obtida com auxílio de colorímetro Minolta, modelo Chroma Corp CR-400, sendo expressa pelo ângulo de cor (Hue), segundo metodologia proposta por Minolta (1994), a qual, a partir da obtenção dos parâmetros a e b, permitiu calcular o ângulo Hue, ou seja, a tonalidade ou matriz da cor. O ângulo Hue equivale ao [arcotangente (b/a)].
- A firmeza da polpa, expressa em Newton e avaliada com texturômetro TA-XT2, ponteira de 8 mm, com distância e velocidade de penetração de 9 mm e 1 mm/s, respectivamente.

4.2.2. Análises químicas

Os frutos tratados, conforme descrito em 4.2.1., também foram submetidos a análises químicas, sendo estas:

- Acidez da polpa, determinada em pHmetro e, além desta, a acidez total titulável (AT), sendo essa última expressa em g de ácido cítrico 100 g⁻¹ de polpa;
- Teor de sólidos solúveis, foi medido em refratômetro e expresso em °Brix;
- Total de carboidratos na casca, expresso pelo conteúdo de açúcares solúveis totais (AST), açúcares redutores (AR) e açúcares não redutores (ANR). Para isso, ao final de cada dia de análise, 1 g de casca de cada repetição foi retirada e macerada na presença de nitrogênio líquido e PVPP, seguida da adição de 5 mL de tampão fosfato de sódio 100 mM (pH 6,0) e centrifugada a 20.000 g por 30 min, a 4 °C. Em seguida, 500 µL dos sobrenadantes (extrato) obtidos foram acrescidos de 500 µL de fenol (5,0%) em água destilada e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Após 30 min de incubação a temperatura ambiente, a absorbância foi determinada a 490 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo U-1900, tendo por base uma curva padrão de glicose (Dubois et al., 1956). O conteúdo de açúcares redutores foi determinado pela adição de 1,5 mL de hidrazida do ácido *p*-hidroxibenzoico (1 g dissolvido em 20 mL de HCl a 0,5 M com adição de 80 mL de NaOH a 0,5 M), em 500 µL de extrato, que foi incubado em banho-maria a 100 °C por 5 min. Após o resfriamento, foi determinada a absorbância da amostra a 410 nm em espectrofotômetro Hitachi, modelo

U-1900, e a concentração de AR determinada com base na curva padrão de glicose (Lever, 1972). A determinação de açúcares não redutores (ANR) foi realizada de maneira indireta através do cálculo: $ANR = AST - AR$. Os resultados desses três grupos de açúcares foram expressos em mg de glicose g⁻¹ de casca.

4.2.3. Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento experimental adotado para a condução dos ensaios foi inteiramente casualizado, composto por dois fatores, sendo: concentrações do extrato de *A. nodosum* (0, 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0%) ou concentrações do fosfito de potássio (0, 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4%) *versus* dias de armazenamento (0, 3, 6, 9 e 12 dias). Os testes foram realizados de modo independente para cada produto e a concentração zero (0) correspondeu ao controle dos testes. Foram utilizadas quatro repetições por tratamento, sendo a parcela experimental composta por dois frutos/bandeja. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Além disso, os dados foram submetidos à análise de regressão linear, sendo considerados altamente correlacionados quando os valores de R² foram maiores ou iguais a 0,70 (Toledo & Ovalle, 2008).

4.3. Resultados E Discussão

Os resultados de massa fresca demonstraram que o extrato de *A. nodosum*, nas diferentes doses aplicadas nos frutos, interferiu de maneira positiva neste parâmetro. Foi observada uma perda acumulada de 8,25% de massa fresca dos frutos que compunham o tratamento controle, ao final do período de armazenamento. Entretanto, frutos tratados com 0,1%, 0,3%, 0,5% e 1,0% do extrato, apresentaram perdas inferiores ao controle e estimadas em 4,93%, 5,20%, 5,69% e 5,62%, respectivamente, ao final de 12 dias de armazenamento. Ou seja, mangas tratadas com o produto tiveram redução nas perdas de massa fresca na faixa dos 40,2%, 36,9%, 31% e 31,9%, respectivamente, para as doses utilizadas, em relação aos frutos do tratamento controle. Vale ressaltar que, avaliando os resultados obtidos pelo tratamento das mangas com o produto, excluindo o controle (concentração zero), a diferença entre o tratamento que mais evitou perda de massa, o tratamento 0,1% do extrato (40,2%), e o tratamento que menos evitou, o tratamento 0,5% do extrato (31%), é de 9,2%, valor que, quando visto pela perspectiva comercial, é bastante significativo e que, por isso, sugere que um novo estudo acerca das concentrações recomendadas para o uso do extrato seja feito (Figura 4.1.).

No ensaio que avaliou o fosfito de potássio, os frutos do tratamento controle tiveram uma perda acumulada de massa fresca de 8,25%, enquanto que, nos frutos tratados com as concentrações 0,1%, 0,2%, 0,3% e 0,4% do sal de potássio, a perda acumulada observada foi de 6,41%, 7,98%, 8,13% e 5,54%, respectivamente, ao final de 12 dias de armazenamento. Em todos os tratamentos, houve redução de perda de massa nos frutos em relação ao controle e estas foram na ordem de 22,2%, 3,29%, 1,48% e 31,05%, respectivamente, em ordem crescente dos tratamentos com o fosfito aplicados. Esses resultados estão apresentados na Figura 4.2.

Figura 4.1. Perda de massa percentual, ao longo de 12 dias, de mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum*

Figura 4.2. Perda de massa percentual, ao longo de 12 dias, de mangas ‘Tommy Atkins’ tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio

A perda de massa durante o armazenamento de frutos é bastante comum e ela está atrelada a fatores como o aumento da atividade respiratória do órgão vegetal no período, aumento da atividade enzimática no fruto e consequente mudança de estágio fenológico. Segundo Chitarra & Chitarra (2005), alguns produtos ainda são comercializáveis com perda de umidade na faixa dos 10%, entretanto, perdas de massa de 3 a 6% já são suficientes para causar expressivo declínio na qualidade desses órgãos vegetais. Não há registros na literatura do uso do extrato de *A. nodosum* e do sal de potássio para o tratamento pós-colheita de frutos, entretanto, a utilização do extrato em condições de campo incrementou a produtividade e melhorou a qualidade de frutos de pimentão, uva ‘Thompson’ e morango, sendo, para este último, relatado também acréscimo do tamanho e peso médio dos frutos (Arthur et al., 2003; Norrie & Keathley, 2005; Roussos et al., 2009). O mesmo foi observado para maracujazeiros tratados com o fosfito de potássio (Junqueira et al., 2011). Plantas tratadas com o produto apresentaram maior produtividade e maior massa fresca de polpa. Dessa maneira, a aplicação dos produtos nas diferentes espécies frutíferas pode implicar em ganhos que compensarão perdas futuras, como as advindas da senescência do fruto na pós-colheita.

A partir da análise de colorimetria foi possível verificar que os frutos, no tempo 0 (zero) de armazenamento, apresentaram alta uniformidade quanto ao ângulo de cor (Hue), não havendo diferenças significativas entre os tratamentos que, em média, apresentaram ângulo de cor na faixa dos 90°, ou seja, na faixa do amarelo. Entretanto, com o passar do tempo foi observada a diminuição desses ângulos de cores no primeiro quadrante (0° a 90°), indicando que a cor dos frutos migrou do amarelo para o vermelho. Dessa forma, a redução do ângulo, no tratamento controle no ensaio com os dois produtos, de 91° para 74,5°, indicou amadurecimento do fruto que, visualmente, apresentou polpa mais amarelada ao longo dos dias (Figuras 4.3.A e 4.4.A)

Comparando essa redução com os demais tratamentos no extrato de *A. nodosum*, o que se notou foi que, apesar de também ter ocorrido redução no ângulo de cor, essa redução foi menos acentuada, sendo de 91,4° para 83,7° na dose 0,1%, de 91,3° para 81,1° na dose 0,3%, de 90,3° para 80,3° na dose 0,5% e de 91,8° para 80,9° na dose 1,0%. A análise de variância demonstrou que o tratamento de frutos com diferentes doses do extrato, gerou respostas significativamente diferentes do controle.

Assim, os frutos tratados com o extrato apresentaram maiores ângulos de cor, portanto, frutos menos maduros em todos os dias de armazenamento. Contudo, pela análise de regressão linear, foi observado que as diferentes concentrações utilizadas nesses testes têm baixa correlação com o ângulo Hue ($R^2 = 0,19$) (Figura 4.3.B).

Nos tratamentos com o fosfito de potássio, somente a concentração 0,2% do produto não diferiu significativamente do controle, as demais, apresentaram ângulos de cor da polpa das mangas, estatisticamente, menores, indicando que, provavelmente, os frutos amadureceram em função da aplicação do sal de potássio. Também nesse caso, o fator “concentração aplicada” pouco interferiu nesse parâmetro (Figura 4.4.B).

Diferentemente, o tempo de armazenamento apresentou forte correlação com o ângulo de cor ($R^2 = 0,98$, para o extrato de algas e $R^2 = 0,99$, para o fosfito de potássio), uma vez que, quanto maior o tempo de armazenamento, menor o ângulo de cor observado, ou seja, os frutos estavam mais maduros (Figuras 4.3.C e 4.4.C). Assim, os ensaios demonstraram que o tempo de armazenamento em mangas, nas condições em que este experimento foi conduzido, influenciou diretamente o amadurecimento do fruto (menor ângulo Hue).

Figura 4.3. Valores médios para o ângulo de cor (Hue) de polpas de manga ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A) e armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o ângulo de cor. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 4.4. Valores médios para o ângulo de cor (Hue) de polpas de manga ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio (A) e armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o ângulo de cor. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Silva et al. (2014) demonstraram que a aplicação foliar do extrato de *A. nodosum* em morangueiros, resultou em frutos de um vermelho menos intenso, ou seja, com o ângulo de cor mais aberto quando comparados ao controle. Isso provavelmente está relacionado à grande capacidade do extrato em aumentar a resistência vegetal à estresses abióticos diversos, como já relatado para videiras (Mancuso et al., 2006), oliveiras (Chouliaras et al., 2009) e em *Arabidopsis thaliana* (Rayirath et al., 2009). Em experimento que verificou o tratamento de maçãs ‘Fuji’ com fosfito de potássio, na concentração 3 mL L⁻¹, foi verificado os menores valores para o ângulo Hue no tratamento controle, ou

seja, frutos de um vermelho mais intenso, portanto, mais maduros do que nos tratamentos com o sal de potássio (Stella et al., 2011). Esses resultados diferem dos observados nos ensaios aqui realizados, uma vez que se observou menores valores para o ângulo, em mangas que receberam a aplicação do produto, comparadas ao controle. Entretanto, existem respostas diferenciais em relação às diferentes espécies vegetais. Por isso, concentrações diferentes do fosfito devem ser testadas para um melhor entendimento do efeito do produto sobre mangas.

As mudanças de coloração em mangas, tanto na casca quanto na polpa, são devidas à decomposição da clorofila e o acúmulo de outros pigmentos. Assim, cloroplastos são transformados em cromoplastos que contêm pigmentos amarelos ou vermelhos (Lakshminarayana, 1980; Parikh et al., 1990; Lizada, 1993). Diferentes tipos de antocianinas e carotenoides, tais como o β -caroteno, ésteres de xantofila, as xantofilas e os licopenos são sintetizados e acumulados nos vacúolos celulares (Tucker & Grierson, 2013; Lizada, 1993). As mudanças na coloração do fruto durante o amadurecimento são variáveis em função do tipo de composto produzido durante o processo. Dependendo do cultivar, o acúmulo de β -carotenos faz com que a coloração da polpa varie de um amarelo menos intenso a um amarelo mais intenso, sendo este último, atrelado, geralmente, ao amadurecimento do órgão. A polpa das mangas tem carotenoides em abundância (aproximadamente 9 mg 100 g⁻¹), sendo predominante os carotenos do tipo *trans* (Chen et al., 2004).

Com relação à firmeza dos frutos, foi verificado que tanto o extrato da alga marinha quanto o fosfito de potássio, incrementou esse parâmetro nos frutos, uma vez que todas as concentrações utilizadas, para os dois produtos, foram significativamente superiores ao controle. Não foi observada alta correlação entre o fator “concentração utilizada” *versus* firmeza do fruto. Em contrapartida, o tempo de armazenamento do fruto interferiu significativamente sobre o parâmetro, sendo a firmeza menor, quanto mais tempo o fruto passava armazenado. Esses resultados estão representados nas Figuras 4.5. para o extrato de *A. nodosum* e 4.6., para o fosfito de potássio.

Extratos de algas têm efeito direto sobre a firmeza de frutos na fase de pós-colheita, como observado em morangos fertirrigados com 4,5 L ha⁻¹ do extrato de *A. nodosum*, que se apresentaram até 45% mais firmes do que frutos não tratados (Silva et al., 2014). Da mesma forma, aumentos significativos na firmeza de melões tratados com o extrato foram observados por Mendonça Júnior (2015). Efeito semelhante ao observado nestes ensaios com mangas, foram observados por Palharini et al. (2016) tratando goiabas ‘Pedro Sato’ com fosfito de potássio. Os autores verificaram que o produto apresentou eficiência semelhante, às observadas para as mangas, na manutenção da firmeza das goiabas tratadas.

O processo fisiológico de amadurecimento dos frutos é acompanhado por modificações nas paredes celulares desses órgãos, caracterizadas pela solubilização, desesterificação e despolimerização da estrutura, seguida de uma extensiva perda de açúcares e ácido galacturônico (Singh et al., 2013). As maiores classes de polissacarídeos da parede celular dos frutos que sofrem tais modificações são as pectinas, as celuloses e as hemiceluloses. O amido é outro importante polissacarídeo presente em mangas, do qual a hidrólise enzimática resulta em pronunciada perda da estrutura celular, seguida de aumento do sabor adocicado nos frutos pelo acúmulo de açúcares (Voragen et al., 1995). Em mangas do cultivar ‘Alphonso’, o conteúdo de polissacarídeos como amido, pectina, celuloses e hemiceluloses sofreram significativo decréscimo com o amadurecimento dos frutos, e concomitante aumento do teor de sólidos solúveis e diminuição da firmeza dessas mangas (Yashoda et al., 2006). A firmeza em frutos é caracterizada pelo aumento da solubilidade das substâncias pécticas formadoras da parede celular (Roe & Bruemmer, 1981; Lazan et al., 1986), e a intensidade do processo está condicionada a cultivar avaliada (Selvaraj et al., 1989). A senescência dos frutos e a diminuição da firmeza destes, é um processo enzimático mediado por exo e endopoligalacturonases, pectato-liases, pectin-metilesterases, β -galactosidases e α -arabinofuranosidases que agem, sinergisticamente, no interior das células do

fruto, reduzindo o tamanho molecular dos polímeros pectínicos, levando a despolimerização da estrutura e aumento da solubilidade de polissacarídeos pectínicos (Roe & Bruemmer, 1981; Ali et al., 2010).

Segundo Silva et al. (2009) a firmeza é um importante parâmetro da qualidade fisiológica do fruto e tem influência direta sobre a comercialização. Assim, frutos com baixa firmeza apresentam menor resistência ao transporte, armazenamento e manuseio. As mudanças na firmeza do fruto na fase de pós-colheita fazem parte do processo de senescência natural do órgão, contudo, fatores externos ao fruto podem acelerar ou retardar o processo como, temperatura, atmosfera controlada e produtos aplicados para a manutenção da qualidade fisiológica, organoléptica e sanitária do vegetal (Silva et al., 2009; Ummarat et al., 2015).

Figura 4.5. Valores médios da firmeza (N) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A) e armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com a firmeza. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 4.6. Valores médios da firmeza (N) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio (A) e armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com a firmeza. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

A análise do pH da polpa dos frutos ao longo dos dias mostrou que os produtos mantiveram o parâmetro abaixo do tratamento controle, tanto para o extrato de algas (Figura 4.7.) quanto para o fosfito de potássio (Figura 4.8.). As diferentes concentrações utilizadas tiveram pouca correlação com o parâmetro ao longo dos ensaios (Figuras 4.7.B e 4.8.B), contudo, aumentos progressivos nos valores de pH foram observados com o passar dos dias de armazenamento das mangas (Figuras 4.7.C e 4.8.C).

Figura 4.7. Valores médios de pH de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o extrato de *Ascophyllum nodosum* (A), armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* o pH. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 4.8. Valores médios de pH de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o fosfito de potássio (A), armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* o pH. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Com relação à acidez titulável (g de ácido cítrico 100 g⁻¹), os ensaios mostraram diminuição progressiva nos valores com o passar dos dias de armazenamento, tanto para o extrato quanto para o fosfito. Os testes mostraram ainda que os dois produtos mantiveram os teores de ácido cítrico acima do tratamento controle, para todos os tempos avaliados (Figuras 4.9.A e 4.10.A). O fator “concentração” diferiu do controle, tanto para o extrato quanto para o fosfito, em todos os valores utilizados, nos quais foram observadas maiores quantidades de ácido cítrico nas mangas (Figuras 4.9.B e 4.10.B). De maneira contrária, quanto maior o tempo de armazenamento das mangas, mais estas

tinham o teor da acidez titulável diminuída, estando, portanto, este parâmetro altamente correlacionado com o tempo de armazenamento dos frutos (Figuras 4.9.C e 4.10.C).

Figura 4.9. Valores médios acidez titulável (g de ácido cítrico 100 g⁻¹), em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o extrato de *Ascophyllum nodosum*, armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) versus a acidez titulável. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 4.10. Valores médios acidez titulável (g de ácido cítrico 100 g⁻¹), em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com o fosfito de potássio, armazenadas a 25 °C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) *versus* a acidez titulável. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Os resultados observados nos respectivos tratamentos são indicações de que os produtos desaceleram o processo normal de senescência em mangas, uma vez que, a diminuição da acidez nos frutos está associada ao consumo de ácidos no processo respiratório, em decorrência da maturação (Chitarra & Chitarra, 2005; Souza et al., 2011).

Os ácidos orgânicos são importantes moléculas constituintes do sabor em frutos. Em mangas, os ácidos orgânicos predominantes são o cítrico, o succínico, o málico e o tartárico; o ácido cítrico é encontrado em maior concentração nos frutos, enquanto que o tartárico é encontrado em concentrações menores (Sarker & Mushi, 1981; Kumar et al., 1993; Singh et al., 2013). Durante a maturação e senescência, os frutos perdem volumes significativos desses ácidos orgânicos. Sendo o ácido cítrico o mais abundante em mangas, frutos de todos os cultivares, com a senescência, têm diminuição dessa molécula o que leva estes, a uma diminuição significativa da acidez do órgão (Ho et al., 1997).

Com relação aos teores de sólidos solúveis, expressos em °Brix, os resultados mostraram que os dois produtos testados e em todas as concentrações utilizadas, mantiveram o parâmetro abaixo do controle (Figuras 4.11.A e 4.12.A). Assim, na interação “teor de sólidos solúveis” *versus* concentração do produto utilizada, verificou-se que todas as concentrações utilizadas do extrato e do fosfito, baixaram, significativamente, os valores de °Brix observados nos frutos, em relação ao controle. Contudo, entre as concentrações dos produtos, aplicadas nos frutos de modo independente para o extrato e para o fosfito, não houve diferenças significativas. As concentrações testadas nestes ensaios e nas condições em que eles foram desenvolvidos, não se correlacionam com o parâmetro “sólidos solúveis” (Figuras 4.11.B e 4.12.B). Adicionalmente, quanto maior o tempo de armazenamento do fruto, maior foi o valor de °Brix nas mangas tratadas (Figuras 4.11.C e 4.12.C).

A aplicação do extrato de *A. nodosum* em morangueiros, tanto por fertirrigação quanto por pulverização foliar, diminuiu o teor de sólidos solúveis em relação ao controle (Silva et al., 2014). Em trabalho anterior, o produto não apresentou qualquer efeito no teor de sólidos solúveis nas cebolas tratadas em relação ao controle (Wordell Filho et al., 2007). Roma (2013) encontrou resultado contrastante com o observado neste trabalho, uma vez que, a autora não verificou alteração no conteúdo de sólidos solúveis em uvas de mesa tratadas com o fosfito de potássio.

A diminuição no teor de sólidos solúveis observada nas amostras tratadas com os produtos sugere a desaceleração do metabolismo do fruto durante o armazenamento, com menor hidrólise da sacarose e consequente utilização de açúcares redutores nos processos respiratórios. O °Brix de mangas ‘Tommy Atkins’ recém maturadas se concentra na faixa dos 17 (Torres et al., 2006; Khan et al., 2008; Medeiros et al., 2012). Assim, conforme os frutos amadurecem, o teor de sólidos solúveis aumenta, sendo estes constituídos, principalmente, por açúcares solúveis (Rocha et al., 2001) e, estando esses valores foram abaixo do tratamento controle para os dois produtos, sugere-se um efeito positivo do extrato e do fosfito, no sentido de aumentar o tempo de prateleira dos frutos, uma vez que, menores teores de sólidos solúveis se traduzem em frutos mais verdes.

Figura 4.11. Valores médios da quantidade de sólidos solúveis (°Brix) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* (A), armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o °Brix. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Figura 4.12. Valores médios da quantidade de sólidos solúveis (°Brix) de mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio (A), armazenadas a 25°C por 12 dias. Análise de regressão linear das concentrações do extrato (B) e dos dias de armazenamento (C) com o °Brix. Colunas seguidas pela mesma letra, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p = 0,05$). As barras sobre as colunas representam o erro padrão da média

Finalmente, a avaliação do conteúdo de carboidratos nas cascas das mangas, ao longo do período de armazenamento, demonstrou que não houve interferência do extrato da alga e do fosfito de potássio nesse parâmetro, em comparação ao tratamento controle. O conteúdo de açúcares totais dos frutos variou muito pouco entre os tempos de coleta (Figuras 4.13A e 4.14A). Entretanto, mesmo não havendo diferenças entre os tratamentos, foi verificado um aumento progressivo no conteúdo de açúcares redutores nas mangas (Figuras 4.13B e 4.14B), em todos os tratamentos e, conseqüentemente, redução dos açúcares não-redutores (Figuras 4.13C e 4.14C).

Figura 4.13. Valores médios do conteúdo de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e açúcares não-redutores (C) em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do extrato de *Ascophyllum nodosum* e armazenadas a 25 °C por 12 dias. As barras sobre os pontos nos gráficos representam o erro padrão da média

Figura 4.14. Valores médios do conteúdo de açúcares totais (A), açúcares redutores (B) e açúcares não-redutores (C) em mangas ‘Tommy Atkins’, tratadas com diferentes concentrações do fosfito de potássio e armazenadas a 25 °C por 12 dias. As barras sobre os pontos nos gráficos representam o erro padrão da média

Existe um alto ganho nos frutos na quantidade de açúcares solúveis durante o amadurecimento, ganho esse, refletido no sabor adocicado, característico de mangas. O amido é quase, completamente, hidrolisado à açúcares mais simples durante a senescência dos frutos, sendo estes, principalmente a glicose, a frutose e a sacarose. Outras formas de açúcares solúveis, tais como a xilose e a maltose, também são encontradas em mangas maduras (Medlicott et al., 1986; Selvaraj et al., 1989; Kumar et al., 1993; Ho et al., 1997). Os níveis de açúcares não-redutores, são elevados no

início da maturação dos frutos e diminuem com o completo amadurecimento do órgão. Simultaneamente, observa-se aumento na concentração de açúcares redutores. Foi exatamente esse comportamento observado nas mangas ‘Tommy Atkins’ avaliadas nestes ensaios.

Mangas maduras contêm, em média, 10-20% do peso fresco composto por açúcares totais. Essa variação depende do cultivar avaliado e do estágio de maturação do fruto (Ho et al., 1997). Em mangas verdes do cultivar ‘Alphonso’, o conteúdo total de amido chega a corresponder a 14% do peso fresco dos frutos, com o amadurecimento, há uma redução deste para 0,3%. No cultivar ‘Keitt’, a sacarose é o principal constituinte dos açúcares solúveis, correspondendo a 57% do total de açúcares nesses frutos, sendo a glicose e a frutose, correspondentes à 28% e 15% dos demais açúcares encontrados no cultivar (Medlicott & Thompson, 1985). Amido é quase indetectável em mangas do cultivar ‘Irwin’, após a maturação. Entretanto, é observado aumento significativo da sacarose nesses frutos (Ho et al., 1997). A oxidação da molécula de amido à sacarose é um processo enzimático que envolve a atividade de três enzimas, a amilase, a sacarose-sintase e a invertase (Fuchs et al., 1980; Tandon & Kalra, 1983; Kumar et al., 1994).

Assim, a maioria dos açúcares redutores encontrada em frutos, é representada pela glicose e frutose, e os açúcares não-redutores, pela sacarose. Os açúcares solúveis totais são representados pela soma desses três sacarídeos (Ribeiro, 2006). Assim, fica explícito que o consumo de sacarose aumenta com a maturação do fruto, resultante do processo de respiração do vegetal. De maneira oposta, a degradação da sacarose pela enzima invertase é acompanhada pelo aumento da glicose e frutose, produtos desse catabolismo, que têm seus teores aumentados com a maturação dos órgãos vegetais.

Os resultados aqui apresentados apontam para uma provável utilização do extrato de algas e do fosfito de potássio na manutenção da qualidade pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’. Contudo, estes dados são preliminares e devem servir de base para um estudo mais acertado sobre o efeito desses produtos na maturação desses frutos.

4.4. Conclusões

O extrato da alga marinha *A. nodosum* e o fosfito de potássio têm efeito positivo sobre diversos parâmetros físicos e químicos de mangas ‘Tommy Atkins’, quando tratadas antes do armazenamento e, portanto, retardam o processo de amadurecimento e senescência desses frutos.

Os efeitos físicos dos produtos sobre os frutos são observados na diminuição da perda de massa das mangas, no retardo da regressão do ângulo de cor da polpa (Hue) e na manutenção da firmeza e, conseqüente, aumento do tempo de prateleira do vegetal.

Quimicamente, os produtos retardam a elevação do pH das mangas e o consumo de ácidos orgânicos, a exemplo do ácido cítrico, mais abundante nos frutos; os produtos mantêm mais baixos os teores de sólidos solúveis, mas não interferem no conteúdo total de açúcares, expresso pelos valores de açúcares redutores e açúcares não-redutores, medidos nas mangas tratadas.

O tempo de armazenamento em mangas altera, sobremaneira, a qualidade fisiológica desses frutos. Contudo, as concentrações do extrato e do fosfito, utilizadas nestes testes, e nas condições em que estes ensaios foram conduzidos, não têm efeito sobre os parâmetros avaliados, sendo, por isso, indicado a realização de novos testes com doses maiores desses produtos que poderão apresentar efeitos, inclusive, mais significativos aos observados nestes testes.

A qualidade fisiológica de frutos é uma variável diretamente correlacionada com o desenvolvimento de doenças nesses vegetais e, uma vez que os produtos retardam a maturação das mangas, desordens de origem biótica também são manejadas.

REFERÊNCIAS

- Ali, A., Maqbool, M., Ramachandran, S., Alderson, P. G. (2010). Gum arabic as a novel edible coating for enhancing shelf-life and improving postharvest quality of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 58(1), 42-47.
- Amaral, D. D., Monteiro, A. L. R., da Silva, E. I., de Oliveira Lins, S. R., & de Oliveira, S. M. A. (2017). Frequência de fungos quiescentes e manejo alternativo da podridão peduncular em mamão na pós-colheita. **Revista Caatinga**, 30(3), 786-793.
- Amariz, A., Coêlho de Lima, M. A., Gomes da Trindade, D. C., Nascimento dos Santos, A. C., Passos Ribeiro, T. (2010). Recobrimentos à base de carboximetilcelulose e dextrina em mangas 'Tommy Atkins' armazenada sob refrigeração. **Ciência Rural**, 40(10).
- Amiri, A.; Bompeix, G. (2011). Control of *Penicillium expansum* with potassium phosphite and heat treatment. **Crop Protection**, 30(1), 222-227.
- Arthur, G. D., Stirk, W. A., Van Staden, J., Scott, P. (2003). Effect of a seaweed concentrate on the growth and yield of three varieties of *Capsicum annum*. **South African Journal of Botany**, 69(2), 207-211.
- Bompard, J. M. (2009). Taxonomy and systematics. **The mango: Botany, production and uses**. Wallingford: CAB International, 19-41.
- Bourscheidt, C. E. (2012). **Bioestimulante e seus efeitos agrônômicos na cultura da soja (*Glycine max* L.)**. Monografia, Agronomia, Ijuí, Rio Grande do Sul, Brasil. 35 p.
- Carvalho, M. E. A. D. (2013). **Efeitos do extrato de *Ascophyllum nodosum* sobre o desenvolvimento e produção de cultivos**. 2013. 70 p. Tese, Doutorado em Produção Vegetal, Universidade de São Paulo, ESALQ, Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Cerioni, L., Sepulveda, M., Rubio-Ames, Z., Volentini, S. I., Rodríguez-Montelongo, L., Smilanick, J. L., Rapisarda, V. A. (2013). Control of lemon postharvest diseases by low-toxicity salts combined with hydrogen peroxide and heat. **Postharvest Biology and Technology**, 83, 17-21.
- Chen, J. P., Tai, C. Y., Chen, B. H. (2004). Improved liquid chromatographic method for determination of carotenoids in Taiwanese mango (*Mangifera indica* L.). **Journal of Chromatography**, 1054(1), 261-268.
- Chitarra, M. I. F., Chitarra, A. B. (2005). **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2.ed. Lavras: UFLA. 785 p.
- Choularas, V., Tasioula, M., Chatzissavvidis, C., Therios, I., Tsalolatidou, E. (2009). The effects of a seaweed extract in addition to nitrogen and boron fertilization on productivity, fruit maturation, leaf nutritional status and oil quality of the olive (*Olea europaea* L.) cultivar Koroneiki. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 89(6), 984-988.
- Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 371-393.
- Crane, J. H., Bally, I. S.E., Mosqueda-Vazquez, R.V., Tomer, E., (1997). Crop production. In: **The Mango: Botany, Production and Uses**. CAB International, Cambridge, UK. p. 203–256.

- Dambros, D., Rocha Monteiro, A. L., Pereira de Melo, A., Rodrigues de Oliveira Lins, S., Alves de Oliveira, S. M. (2016). Caracterização epidemiológica e fosfitos no manejo da podridão por *Aspergillus niger* em uva de mesa. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, 11(3).
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. T., Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, 28(3), 350-356.
- FAO. (2012). **Crops**. Disponível em <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>>. Acesso em 13 mai. 2017.
- Fischer, I. H., Palharini, M. C. A., Santos, A. P., Nogueira Júnior, A. F., Parisi, M., Cagnin, M. (2016). Incidência de pinta preta e características físico-químicas de goiabas submetidas a tratamentos pós-colheita. **Comunicata Scientiae**, 7(3).
- FRAC. Fungicide Resistance Action Committee. (2017). Disponível em <<http://www.frac.info/resistance-overview/mechanisms-of-fungicide-resistance>>. Acesso em 19 de mai. 2017.
- Fuchs, Y., Pesis, E., Zauberman, G. (1980). Changes in amylase activity, starch and sugars contents in mango fruit pulp. **Scientia Horticulturae**, 13(2), 155-160.
- Gomez-Lim, M. A., Valdes-Lopez, V. A., Cruz-Hernandez, Saucedo-Ariask, L. J. (1993). Isolation and characterization of a gene involved in ethylene biosynthesis from *Arabidopsis thaliana*. **Gene**, 134, 217-221.
- Ho, T., Sasaki, K., Yoshida, Y. (1997). Changes in respiration rate, saccharide and organic acid content during the development and ripening of mango fruit (*Mangifera indica* L. 'Irwin') cultured in a plastic house. **Journal from Japanese Society of Horticultural Science**, 66, 629-635.
- Jayaraman, J., Norrie, J., Punja, Z. K. (2011). Commercial extract from the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* reduces fungal diseases in greenhouse cucumber. **Journal of Applied Phycology**, 23(3), 353-361.
- Joshipura, K. J., Hu, F. B., Manson, J. E., Stampfer, M. J., Rimm, E. B., Speizer, F. E., Willett, W. C. (2001). The effect of fruit and vegetable intake on risk for coronary heart disease. **Annals of Internal Medicine**, 134(12), 1106-1114.
- Junqueira, K. P., Faleiro, F. G., Uesugi, C. H., Junqueira, N. T. V., Bellon, G., Santos, E. C. D., Ramos, L. N. (2011). Desempenho agrônomo de maracujazeiros tratados com produtos alternativos e fertilizantes foliares. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 33(1), 040-047.
- Kalra, S. K., Yadav, I. S., Sinha, G. C. (1994). Screening of some north Indian non-commercial mango varieties for processing. **Indian Journal of Horticulture**, 51, 136-140.
- Khan, M. A. M., Ahrné, L., Oliveira, J. C., Oliveira, F. A. R. (2008). Prediction of water and soluble solids concentration during osmotic dehydration of mango. **Food and Bioproducts Processing**, 86(1), 7-13.
- Khan, S. A., Hussain, M. Z., Prasad, S., Banerjee, U. C. (2009). Prospects of biodiesel production from microalgae in India. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, 13(9), 2361-2372.
- Kim, Y., Brecht, J. K., Talcott, S. T. (2007). Antioxidant phytochemical and fruit quality changes in mango (*Mangifera indica* L.) following hot water immersion and controlled atmosphere storage. **Food Chemistry**, 105(4), 1327-1334.
- Kumar, S., Das, D. K., Singh, A. K., Prasad, U. S. (1993). Changes in nonvolatile organic acid composition and pH during maturation and ripening of two mango cultivars. **Indian Journal of Plant Physiology**, 36, 107-111.
- Lai, T., Wang, Y., Fan, Y., Zhou, Y., Bao, Y., Zhou, T. (2017). The response of growth and patulin production of postharvest pathogen *Penicillium expansum* to exogenous potassium phosphite treatment. **International Journal of Food Microbiology**, 244, 1-10.
- Lakshminarayana, S. (1980). Mango. **Tropical and Subtropical Fruits**, 184-257.

- Lazan, H., Ali, Z., Lee, K., Voon, J., Chaplin, G. (1986). The potential role of polygalacturonase in pectin degradation and softening of mango fruit. **Asian Food Journal**, 2(3-4), 93-98.
- Lima, R. A. Z., Abreu, C. M. P. D., Asmar, S. A., Corrêa, A. D., Santos, C. D. (2010). Embalagens e recobrimento em lichias (*Litchi chinensis* Sonn.) armazenadas sob condições não controladas. **Ciência e Agrotecnologia**, 34(4), 914-921.
- Lizada, C. (1993). Mango. In: **Biochemistry of fruit ripening**. Netherlands: Springer. p. 255-271.
- Machinandiarena, M. F., Lobato, M. C., Feldman, M. L., Daleo, G. R., Andreu, A. B. (2012). Potassium phosphite primes defense responses in potato against *Phytophthora infestans*. **Journal of Plant Physiology**, 169(14), 1417-1424.
- Mancuso, S., Azzarello, E., Mugnai, S., Briand, X. (2006). Marine bioactive substances (IPA extract) improve foliar ion uptake and water stress tolerance in potted *Vitis vinifera* plants. **Advances in Horticultural Science**, 156-161.
- Masibo, M., He, Q. (2009). *In vitro* antimicrobial activity and the major polyphenol in leaf extract of *Mangifera indica* L. **Malaysian Journal of Microbiology**, 5(2), 73-80.
- Medeiros, B. G. D. S., Pinheiro, A. C., Carneiro-da-Cunha, M. G., Vicente, A. A. (2012). Development and characterization of a nanomultilayer coating of pectin and chitosan—Evaluation of its gas barrier properties and application on ‘Tommy Atkins’ mangoes. **Journal of Food Engineering**, 110(3), 457-464.
- Medlicott, A. P., Bhogal, M., Reynolds, S. B. (1986). Changes in peel pigmentation during ripening of mango fruit (*Mangifera indica* var. Tommy Atkins). **Annals of Applied Biology**, 109(3), 651-656.
- Medlicott, A. P., Thompson, A. K. (1985). Analysis of sugars and organic acids in ripening mango fruits (*Mangifera indica* L. var Keitt) by high performance liquid chromatography. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 36(7), 561-566.
- Mendonça Júnior, A. F. D. (2015). **Crescimento, produção e qualidade de melão e melancia cultivadas sob extrato de alga *Ascophyllum nodosum* (L.)**. 2015. 126 p. Tese, Doutorado em Fitotecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.
- Minolta Corporation. (1994). **Precise color communication: color control from feeling to instrumentation**. Minolta.
- Mukherjee, S. K. (1953). The mango – Its botany, cultivation, uses and future improvement, especially as observed in India. **Economic Botany**, 7(2), 130-162.
- Mukherjee, S. K. 1997. Introduction: botany and importance. In: **The Mango: Botany, Production and Uses**. CABI International, Cambridge, UK. p. 1-19.
- Norrie, J., Keathley, J. P. (2005). Benefits of *Ascophyllum nodosum* marine-plant extract applications to Thompson seedless grape production. In: **X International Symposium on Plant Bioregulators in Fruit Production**, 727. p. 243-248.
- Parikh, H. R., Nair, G. M., Modi, V. V. (1990). Some structural changes during ripening of mangoes (*Mangifera indica* var. Alphonso) by abscisic acid treatment. **Annals of Botany**, 65(2), 121-127.
- Pelá, A., Sales-Rodrigues, M., Silva Santana, J. D., Teixeira, I. R. (2009). Fontes de fósforo para adubação foliar na cultura do feijoeiro. **Scientia Agraria**, 10(4).
- Plotto, A., Narciso, J. A., Rattanapanone, N., Baldwin, E. A. (2010). Surface treatments and coatings to maintain fresh-cut mango quality in storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 90(13), 2333-2341.
- Rayirath, P., Benkel, B., Hodges, D. M., Allan-Wojtas, P., MacKinnon, S., Critchley, A. T., Prithiviraj, B. (2009). Lipophilic components of the brown seaweed, *Ascophyllum nodosum*, enhance freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **Planta**, 230(1), 135-147.

- Reuveni, M., Sheglov, D., Cohen, Y. (2003). Control of moldy-core decay in apple fruits by β -aminobutyric acids and potassium phosphites. **Plant Disease**, 87(8), 933-936.
- Ribeiro, R.V. (2006). **Variação sazonal da fotossíntese e relações hídricas de laranjeira 'Valência'**. 2006. 157 p. Tese, Doutorado em Agronomia: Área de Concentração em Fitotecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, Brasil.
- Rocha, R. H. C., Menezes, J. B., Morais, E. D., Silva, G. D., Ambrósio, M. D. Q., Alvez, M. Z. (2001). Uso do índice de degradação de amido na determinação da maturidade da manga 'Tommy Atkins'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 23(2), 302-305.
- Roe, B., Bruemmer, J. H. (1981). Changes in pectic substances and enzymes during ripening and storage of "Keitt" mangos. **Journal of Food Science**, 46(1), 186-189.
- Roma, R. C. C. (2013). **Fosfito de potássio no controle de doenças pós-colheita em bagas de uva Itália e possíveis mecanismos de ação à *Rhizopus stolonifer***. 2013. 117p. Doutorado em Fitopatologia, ESALQ, Piracicaba, Brasil.
- Roussos, P. A., Denaxa, N. K., Damvakaris, T. (2009). Strawberry fruit quality attributes after application of plant growth stimulating compounds. **Scientia Horticulturae**, 119(2), 138-146.
- Sarker, S., Muhsi, A. A. (1981). A study on the content and interconversion of organic acids of mango (*Mangifera indica* L.) at various stages of fruit development. **Bangladesh Journal of Agriculture Science**, 8, 69-75.
- Schieber, A., Ullrich, W., Carle, R. (2000). Characterization of polyphenols in mango puree concentrate by HPLC with diode array and mass spectrometric detection. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 1(2), 161-166.
- Selvaraj, Y., Kumar, R., Pal, D. K. (1989). Changes in sugars, organic acids, amino acids, lipid constituents and aroma characteristics of ripening mango (*Mangifera indica* L.) fruit. **Journal of Food Science and Technology**, 26(6), 308-313.
- Siddique, H. R., Saleem, M. (2011). Beneficial health effects of lupeol triterpene: a review of preclinical studies. **Life Sciences**, 88(7), 285-293.
- Silva, D. F. P., Siqueira, D. L., Pereira, C. S., Salomão, L. C. C., Struiving, T. B. (2009). Caracterização de frutos de 15 cultivares de mangueira na Zona da Mata mineira. **Revista Ceres**, 56(6).
- Silva, J. F., Pinheiro, R. F., Amaro, A. L., Pereira, M. J., Roriz, M., Aguiar, A., Carvalho, S. M. (2014). Otimização da aplicação de um bio-estimulante para o aumento da produtividade e qualidade do morango. **Actas Portuguesas de Horticultura**, 23, 380-388.
- Singh, P., Singh, M. K., Kumar, V., Kumar, M., Malik, S. (2012). Effect of physico-chemical treatments on ripening behavior and post-harvest quality of Amrapali mango (*Mangifera indica* L.) during storage. **Journal of Environmental Biology**, 33(2), 227.
- Singh, Z., Singh, R. K., Sane, V. A., Nath, P. (2013). Mango-postharvest biology and biotechnology. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 32(4), 217-236.
- Souza, M. L. D., Morgado, C. M. A., Marques, K. M., Mattiuz, C. F. M., Mattiuz, B. H. (2011). Pós-colheita de mangas 'Tommy Atkins' recobertas com quitosana. **Revista Brasileira de Fruticultura**, 337-343.
- Stella, P. F., Steffens, C. A., do Amarante, C. V. T., Martin, M. S. (2014). Maturity, ripening of fruit and control of *Penicillium* spp. rotteness in 'Fuji' apples with the preharvest application of resistance inducers. **Revista de Ciências Agroveterinárias (Journal of Agroveterinary Sciences)**, 12(1), 31-38.

- Tandon, D. K., Kalra, S. K. (1983). Changes in sugars, starch and amylase activity during development of mango fruit cv. Dashehari. **Journal of Horticultural Science**, 58(3), 449-453.
- Toledo, G. L., Ovalle, I. I. (2008). **Estatística Básica**. 2. ed. São Paulo: Atlas. 459 p.
- Terry, L. A., Joyce, D. C. (2004). Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, 32(1), 1-13.
- Torres, J. D., Talens, P., Escriche, I., Chiralt, A. (2006). Influence of process conditions on mechanical properties of osmotically dehydrated mango. **Journal of Food Engineering**, 74(2), 240-246.
- Treichel, M., Kist, B. B., Santos, C. E., Carvalho, C., Beling, R. R. (2016). **Anuário Brasileiro da Fruticultura 2016**. Editora Gazeta Santa Cruz: Santa Cruz do Sul. 88 p.
- Tucker, G. A., Grierson, D. (2013). Fruit ripening. **The Biochemistry of Plants**, 12, 265-319.
- Ummerat, N., Arpaia, M. L., Obenland, D. (2015). Physiological, biochemical and sensory characterization of the response to waxing and storage of two mandarin varieties differing in postharvest ethanol accumulation. **Postharvest Biology and Technology**, 109, 82-96.
- Vasquez, G. H., Lazarini, E., Camargo, F. P. D., Ferreira, R. B., Peres, A. R. (2014). Produtividade, qualidade fisiológica e composição química de sementes de crambe em diferentes doses de fósforo. **Bioscience Journal**, 707-714.
- Voragen, A. G. J., Pilnik, W., Thibault, J. F., Axelos, M. A.V., Renard, C. M. C. G. (1995). Pectins. In: **Food Polysaccharides and their Applications**. New York: Marcel Dekker Inc. p. 287-339.
- Wordel Filho, J. A. W., Martins, D. A., Stadnik, M. J. (2007). Aplicação foliar de tratamentos para o controle do míldio e da podridão-de-escamas de bulbos de cebola. **Horticultura Brasileira**, 25(4).
- Yashoda, H. M., Prabha, T. N., Tharanathan, R. N. (2006). Mango ripening: changes in cell wall constituents in relation to textural softening. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 86(5), 713-721
- Zaharah, S. S., Singh, Z., Symons, G. M., Reid, J. B. (2013). Mode of action of abscisic acid in triggering ethylene biosynthesis and softening during ripening in mango fruit. **Postharvest Biology and Technology**, 75, 37-44.