



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS PATO BRANCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA



ÁLVARO RODRIGO FREDDO

**QUITOSANA *IN VITRO* E NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE
EUCALIPTO E ACÁCIA-NEGRA NO CONTROLE DE *Rhizoctonia
solani* E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS**

DISSERTAÇÃO

PATO BRANCO

2012

ÁLVARO RODRIGO FREDDO

**QUITOSANA *IN VITRO* E NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE
EUCALIPTO E ACÁCIA-NEGRA NO CONTROLE DE *Rhizoctonia*
solani E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Agronomia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia - Área de Concentração: Produção vegetal.

Orientador: Dr. Sérgio Miguel Mazaro
Co-Orientador: Dr. Eleandro José Brun

PATO BRANCO

2012

Catálogo na Fonte por Elda Lopes Lira CRB9/1295

F852 q

Freddo, Álvaro Rodrigo

Quitosana *in vitro* e no tratamento de sementes de eucalipto e acácia-negra no controle de *Rhizoctonia solani* e no desenvolvimento inicial das plântulas./
Álvaro Rodrigo Freddo – 2012.

78 f. : il. ; 30 cm

Orientador: Sérgio Miguel Mazaró

Co-orientador: Eleandro José Brun

**Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.
Programa de Pós-Graduação em Agronomia. Pato Branco/PR, 2012.**

Bibliografia: f. 54–64.

1. *Eucalyptus saligna*. 2. *Acacia mearnsii*. 3. Quitosana. I. Mazaró, Sérgio Miguel, orient. II. Brun, Eleandro José, co-orient. III. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Agronomia. IV. Título.

CDD:(22. ed.) 630



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Gerência de Ensino e Pesquisa
Programa de Pós-Graduação em Agronomia



TERMO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação n° 007/2012

QUITOSANA *IN VITRO* E NO TRATAMENTO DE SEMENTES DE EUCALIPTO E ACÁCIA-NEGRA NO CONTROLE DE *Rhizoctonia solani* E NO DESENVOLVIMENTO INICIAL DAS PLÂNTULAS

por

ÁLVARO RODRIGO FREDDO

Dissertação apresentada às 9 horas do dia 24 de fevereiro de 2012, como requisito parcial para obtenção do título de MESTRE EM AGRONOMIA, Linha de Pesquisa – Produção Vegetal, Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco. O candidato foi argüido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gilmar Franzener
UFFS

Prof. Dr. Américo Wagner Júnior
UTFPR

Prof. Dr. Eleandro José Brun
UFPR
Co-Orientador

Prof. Dr. Sérgio Miguel Mazaro
UTFPR
Orientador

Visto da Coordenação:

Prof. Dr. André Brugnara Soares
Coordenador do PPGA

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a DEUS por estar sempre presente em minha vida e iluminando meu caminho.

À minha família, um agradecimento especial pelo apoio e incentivo, especialmente aos meus pais Arthur e Salete e aos meus irmãos Ademir e Ana.

Aos meus amigos que sempre me incentivaram a seguir em frente em busca dos meus objetivos.

À UTFPR, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, por ter me dado esta oportunidade de ser aluno do mestrado.

Ao meu orientador Sérgio Miguel Mazaro, pela confiança e pela sua dedicação.

Ao meu co-orientador Eleandro José Brun, por suas colaborações.

Ao ex e ao atual coordenador do PPGA, Idemir Citadin e André Brugnara, pela dedicação ao programa.

Ao Prof. Américo Wagner Júnior, ao Técnico de Laboratório Juliano Zanela, e aos acadêmicos Cristiano Hössel e Jéssica Scarlet Marth Alves de Oliveira e a toda equipe do Laboratório de Fitossanidade e Bioquímica da UTFPR – Câmpus Dois Vizinhos, por toda a ajuda e incentivo que me deram durante todo o período de análises laboratoriais.

Ao acadêmico Anathan Bichel, bolsista do Viveiro Florestal pela ajuda na implantação, condução e avaliação do experimento neste setor.

À professora Simone Neumann Wendt pelo empréstimo de seu material para implantação do experimento no Viveiro Florestal.

À empresa TANAGRO SA de Montenegro/RS por ceder sementes de acácia-negra para realização deste trabalho, em especial ao Eng^o Florestal Jeferson de Oliveira, funcionário desta e ex-colega de faculdade.

À professora Claudia Moura pela ajuda na realização do trabalho no Laboratório de Fitossanidade.

Aos meus colegas de mestrado pelo apoio, incentivo e ajuda mútua durante o curso.

Ao professor e Eng^o Florestal Juarez Martins Hoppe (*In memorian*), grande incentivador em minha trajetória profissional.

Um agradecimento especial aos meus ex-alunos da UTFPR e aos meus atuais alunos da UNISEP pelo apoio e incentivo no trabalho.

E a todas as pessoas que colaboraram para a realização deste trabalho.

“Se as portas da percepção fossem abertas, tudo apareceria ao homem como é: infinito.”

William Blake

RESUMO

FREDDO, Álvaro Rodrigo. Quitosana *in vitro* e no tratamento de sementes de eucalipto e acácia-negra no controle de *Rhizoctonia solani* e no desenvolvimento inicial das plântulas. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2012.

A quitosana é polímero derivado da desacetilação da quitina, a qual é encontrada em grande quantidade na carapaça de crustáceos, sendo estudada com potencial para controle de fitopatógenos, tanto por sua ação fungistática direta, quanto pela capacidade de induzir a defesa das plantas, indicando-se a presença de moléculas com características elicitoras. Nesse sentido foram desenvolvidos três experimentos no ano de 2011, na Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Dois Vizinhos, com objetivos de avaliar o potencial deste polímero na indução de resistência de plântulas de *Acacia mearnsii* e *Eucalyptus saligna* ao tombamento de mudas, bem como o efeito fungistático à *Rhizoctonia solani in vitro*. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com cinco tratamentos, correspondendo às concentrações de zero; 0,25; 0,5; 1 e 2% de quitosana, com cinco repetições. O Experimento I avaliou o potencial fungistático das cinco concentrações de quitosana no meio BDA sobre *R. solani in vitro*. Em placas de Petri® foram adicionados o meio de cultura BDA e a quitosana nas diferentes concentrações. Após a solidificação, foi colocado um disco de 10 mm de diâmetro no centro da placa, com micélio de *R. solani*. As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. durante quatro dias a 25°C, sendo avaliado o diâmetro do halo de crescimento do fungo, nos períodos de 48; 72 e 96 horas. O Experimento II avaliou a indução de resistência em plântulas de *E. saligna* em resposta ao tratamento das sementes com quitosana. As sementes de *E. saligna* foram semeadas em substrato contaminado com micélio de *R. solani* cultivado e mantidas em estufa por 28 dias. Avaliou-se, durante e após o período, a porcentagem de emergência, o índice de velocidade de emergência, o *damping-off* de pós-emergência, a altura, o comprimento radicular e a massa de matéria fresca das plântulas, além das variáveis bioquímicas (teor de proteínas, de compostos fenólicos e a atividade da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL)). O Experimento III foi realizado com a espécie *A. mearnsii* e seguiu os mesmos procedimentos metodológicos de instalação e avaliação do Experimento II, diferindo apenas no tempo de permanência na estufa (22 dias). Os resultados obtidos demonstraram que a quitosana apresenta efeito fungistático sobre *R. solani in vitro*. Além disso, apresentou capacidade de alteração da atividade da enzima FAL do *E. saligna* e da *A. mearnsii*, entretanto, somente nesta última houve redução da incidência de tombamento. O uso de concentrações de quitosana entre 0,6% e 0,9% são as mais recomendáveis para a *A. mearnsii*, por reduzirem o tombamento e proporcionarem maior desenvolvimento inicial das plântulas.

Palavras-chave: *Eucalyptus saligna*; *Acacia mearnsii*; Indução de resistência.

ABSTRACT

FREDDO, Álvaro Rodrigo. Chitosan *in vitro* and in seed treatment of eucalyptus and acacia in the control of *Rhizoctonia solani* and in the seedling development. 2012. 78f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2012.

Chitosan is a polymer derived from deacetylation of chitin, which is found in large amounts in shells of crustaceans and several studies have demonstrated the potential of this product in the control of pathogens, by both their direct fungistatic action, and the ability to induce defense in plants, indicating the presence of molecules with characteristic elicitors. In this sense three experiments were developed in 2011, in the Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Dois Vizinhos, with the objective to evaluate the potential of the polymer in the induction of resistance in seedlings of *Acacia mearnsii* and *Eucalyptus saligna* at "Damping-off" and the fungistatic effect on *Rhizoctonia solani in vitro*. The experimental design was completely randomized with five treatments, corresponding to the concentrations: zero, 0.25, 0.5, 1 and 2%, with zero concentration being distilled water, in five repetitions. The first experiment evaluated the fungistatic potential of different concentrations of chitosan in PDA medium on *R. solani in vitro*. In Petri plates were added to the culture medium PDA with chitosan at different concentrations. After solidification, a disk with 10 mm of diameter was placed in the center of the plate with mycelium of *R. solani*. The plates were kept in B.O.D. incubator for four days at 25°C, and evaluated the diameter of the halo of growth of the fungus, in periods of 48, 72 and 96 hours. The second experiment evaluated the induction of resistance in seedlings of *E. saligna* in response to seed treatment with chitosan. The seeds of *E. saligna* were sown on contaminated substrate with mycelium of *R. solani* and incubated in greenhouse for 21 days. Was evaluated during and after the period: the percentage of emergence, emergence rate index, the post-emergence "Damping-off", height, root length and seedling fresh weight, and biochemical parameters: protein and phenolic compounds content of tissue plants and enzyme activity phenilalanina ammonia-lyase (PAL). The third experiment was conducted with the specie *A. mearnsii* and followed the same methodological procedures for installation and evaluation of the second experiment, differed only in length of stay in the greenhouse, kept 17 days. The results showed that chitosan at all concentrations, inhibited the growth of the fungus *R. solani in vitro*, the inhibition was greater with increasing polymer concentration. Chitosan has demonstrated activity in the induction of resistance, favorably affecting silvicultural and biochemical parameters for both the *E. saligna* as for *A. mearnsii*, and the concentration that brought the best results of the seedlings was 0.5% chitosan in the treatment of seeds. The results demonstrated decreased that chitosan has potential fungistatic effect on *R. solani in vitro*. Besides, presented capacity change of the activity of the PAL enzyme from *E. saligna* and *A. mearnsii*, however, only the latter showed a reduction in the incidence of *damping-off*. The use of chitosan concentrations of between 0.6% and 0.9% are most appropriate to *A. mearnsii* by reducing the *damping-off* and provide greater initial seedling growth.

Key-words: *Eucalyptus saligna*; *Acacia mearnsii*; Induction of resistance.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1: Marcação dos diâmetros A e B utilizados para avaliar o experimento *in vitro*. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 32
- Figura 2: Instalação do Experimento II no Viveiro Florestal da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 35
- Figura 3: Instalação do Experimento III no Viveiro Florestal da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 38
- Figura 4: Efeito fungistático de cinco concentrações de quitosana no meio BDA, sobre *R. solani*, analisadas 48; 72 e 96 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011, 40
- Figura 5: Detalhe da inibição do crescimento micelial de *R. solani* comparando as cinco concentrações de quitosana (A = 0%; B = 0,25%; C = 0,5%; D = 1% e E = 2%), na avaliação de 96 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 40
- Figura 6: Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de plântulas de *E. saligna*, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, quinze dias após a semeadura, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 42
- Figura 7: Comprimento da radícula de plântulas de *E. saligna* com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 43
- Figura 8: Teor de FAL de plântulas de *E. saligna* originárias de sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 45

Figura 9: Incidência de <i>damping-off</i> em plântulas de <i>A. mearnsii</i> oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011	47
Figura 10: Altura de plântulas de <i>A. mearnsii</i> oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011	48
Figura 11: Comprimento da radícula de plântulas de <i>A. mearnsii</i> oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011	48
Figura 12: Teor de proteínas (mg.g^{-1} de tecido) de plântulas de <i>A. mearnsii</i> , oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011	49
Figura 13: Teor de FAL de plântulas <i>A. mearnsii</i> , oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVOS	15
2.1 Geral.....	15
2.2 Específicos.....	15
3 EMBASAMENTO TEÓRICO	16
3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CULTURA DO <i>Eucalyptus saligna</i> E DA <i>Acacia mearnsii</i>	16
3.2 <i>DAMPING-OFF</i>	17
3.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS.....	21
3.4. QUITOSANA NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 EXPERIMENTO I: EFEITO FUNGISTÁTICO <i>IN VITRO</i> DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA SOBRE <i>R. solani</i>	31
4.2. EXPERIMENTO II – EMERGÊNCIA, DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLÂNTULAS DE <i>E. saligna</i> com AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA.....	32
4.3 EXPERIMENTO III – EMERGÊNCIA, DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLÂNTULAS DE <i>A. mearnsii</i> com AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA.....	37
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
5.1. EXPERIMENTO I: EFEITO FUNGISTÁTICO <i>IN VITRO</i> DE QUITOSANA SOBRE <i>R. solani</i>	39
5.2. EXPERIMENTO II – DESENVOLVIMENTO INICIAL E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE PLÂNTULAS DE <i>E. saligna</i> COM AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA.....	41
5.3. EXPERIMENTO III – DESENVOLVIMENTO INICIAL E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE PLÂNTULAS DE <i>A. mearnsii</i> COM AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA.....	45
6 CONCLUSÕES	52
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	54
APÊNDICES	68

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o sétimo lugar entre os países com maior plantio florestal do mundo (MACHADO; SILVA; PEREIRA, 2008), sendo que as espécies mais plantadas pertencem aos gêneros *Pinus* e *Eucalyptus*, as quais representam 93% de 6,6 milhões hectares de florestas plantadas em nosso país. Espécies do gênero *Acacia* também merecem destaque no setor florestal entre as mais plantadas, ocupando área de 2,75% do total plantado (BRASIL, 2009).

A manutenção desta área florestal plantada e o aumento da mesma requerem maior produção de mudas por parte dos viveiros especializados, que devem ter como premissa a qualidade das plantas para obtenção de floresta com boa produtividade no campo.

De acordo com Wendling et al. (2002), a qualidade das mudas está relacionada com um sistema radicular e uma parte aérea bem formada, bom estado nutricional, e ausência de pragas e doenças, o que trará altas taxas de sobrevivência e desenvolvimento após o plantio.

Dentre as doenças que podem ocorrer nos viveiros florestais está o tombamento ou *damping-off*, doença que de acordo com Bedendo (2011), afeta tecidos vegetais jovens, ainda dependentes ou recém-libertados das reservas nutricionais acumuladas na semente. Entre os agentes causais mais comuns de doenças deste grupo estão os fungos dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora*.

A utilização de medidas de controle contra agentes causadores de *damping-off*, principalmente aquelas relacionadas com a redução do inóculo do patógeno, a promoção do rápido desenvolvimento da plântula e o controle do ambiente de forma que não seja favorável ao patógeno, são de suma importância, podendo-se citar como exemplo o: uso de sementes saudáveis, o tratamento de sementes com fungicidas ou com organismos antagônicos, o tratamento de solo com fungicidas e a rotação de culturas (BEDENDO, 2011).

A utilização de fungicidas está entre as principais medidas para o controle de patógenos causadores de tombamento de plântulas. Entretanto, de acordo com Schwan-Estrada et al. (2000), a utilização destes produtos tem efeito

positivo a curto prazo, mas a longo prazo os efeitos podem ser negativos, uma vez que pode haver o surgimento de isolados de fitopatógenos resistentes às substâncias químicas aplicadas e também devido aos resíduos dos mesmos, que podem causar danos ao meio ambiente e para a sociedade como um todo por meio de seu potencial poluidor, Silva e Coelho (2003) encontraram isolados de *Botrytis cinerea* em mudas de *Eucalyptus* sp. resistentes ao fungicida Benomyl, fungo que pode causar tombamento das plântulas deste gênero, dentre outras enfermidades.

Neste sentido, buscando evitar esses problemas, produtos naturais vêm sendo estudados e utilizados para o controle de doenças de plantas, dentre os quais têm-se a quitosana. De acordo com Azevedo et al. (2007), a quitosana trata-se de um amino polissacarídeo derivado da desacetilação da quitina, que constitui-se a maior parte dos exoesqueletos de insetos e crustáceos e da parede celular dos fungos, fazendo com que seja considerada após a celulose, como composto orgânico mais importante da natureza.

A quitosana, por ser produto natural, de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, tem sido proposta como material potencialmente atraente para diversos usos (AZEVEDO et al., 2007), como por exemplo, ser alternativa a pesticidas sintéticos na indução de resistência a doenças (ARYA, 2010).

Entretanto, ainda são raros os trabalhos que busquem avaliar o efeito do indutor quitosana sobre doenças de plântulas florestais, com isso a confirmação da indução de resistência em *Eucalyptus saligna* e *Acacia mearnsii*, ou do efeito fungistático sobre o patógeno, permitirá desenvolver estratégias de controle através da ativação das defesas, bem como, servir de base para estudo em outros patossistemas.

Foram desenvolvidos três experimentos, sendo que no Experimento I, avaliou-se o efeito fungistático *in vitro* de diferentes concentrações de quitosana sobre *R. solani*. Nos Experimentos II e III, avaliou-se o tratamento de sementes das espécies florestais *E. saligna* e *A. mearnsii*, respectivamente, sobre o desenvolvimento inicial das plântulas e controle do tombamento. Realizou-se nestes experimentos (II e III), análises bioquímicas de tecidos foliares, buscando-se relacionar a indução de compostos ativados relacionados à patogênese pelo uso de quitosana.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o potencial da quitosana na indução de resistência ao tombamento de mudas e no desenvolvimento inicial de plântulas de *Eucalyptus saligna* Smith e *Acacia mearnsii* De Wild, bem como, seu efeito fungistático sobre *Rhizoctonia solani in vitro*.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito fungistático da quitosana no controle *in vitro* do fungo *Rhizoctonia solani*;

Analisar o efeito da quitosana sobre o desenvolvimento inicial das plântulas de *E. saligna* e *A. mearnsii* e sobre o controle do tombamento;

Verificar, por meio de análises bioquímicas dos tecidos foliares, a indução de compostos relacionados à patogênese ativados pelo uso de quitosana, nas plântulas de *E. saligna* e *A. mearnsii*.

3 EMBASAMENTO TEÓRICO

3.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A CULTURA DO *Eucalyptus saligna* E DA *Acacia mearnsii*

O comércio mundial em 2007 movimentou cerca de US\$ 10 trilhões, tendo os produtos de origem florestal a colocação entre os 10 principais do mercado mundial, com 3% do comércio global, englobando cerca de US\$ 300 bilhões (SBS, 2008).

Neste mesmo ano, o setor florestal no Brasil, foi responsável por cerca de 3,4% do Produto Interno Bruto Nacional, ou seja, envolvendo US\$ 44,6 bilhões, o que mostra o seu potencial para crescer face ao mercado mundial (SBS, 2008), além de ser responsável por 4,7 milhões de empregos diretos e indiretos no território nacional (ABRAF, 2011).

Dentre as espécies mais plantadas no país estão as do gênero *Eucalyptus* sp. em primeiro lugar, seguido do gênero *Pinus* sp., da seringueira (*Hevea brasiliensis*) em terceiro e do gênero *Acacia* em quarto. De acordo com a ABRAF (2011), a área total de reflorestamentos no Brasil correspondeu a 6.973.083 ha, dos quais 68,2% são ocupados por espécies do gênero *Eucalyptus*, e 1,8% com espécies do gênero *Acacia*.

Os eucaliptos são originários da Austrália, existindo segundo Brooker (2002) cerca de 800 espécies descritas para este gênero.

O eucalipto, dentre as inúmeras espécies existentes, está entre as mais plantadas no mundo todo, devido principalmente a suas peculiaridades, como rápido crescimento, boa produtividade, alta capacidade adaptativa e aplicação para diversas finalidades (MORA; GARCIA, 2000).

Dentre as espécies de eucalipto mais plantadas no Brasil, está o *Eucalyptus saligna*, o qual é natural das latitudes 21° a 36° Sul da Austrália, ocupando sítios desde o nível do mar até mais de 1000 m de altitude (MORA; GARCIA, 2000).

Os eucaliptos possuem múltiplos usos, como madeira para construção, energia e polpa, além da produção de óleos essenciais, fazendo com que este gênero seja valioso e plantado no mundo todo (BROOKER, 2002).

O *E. saligna* possui madeira clara de baixa densidade apta para a produção de celulose e diversas finalidades (MORA; GARCIA, 2000), inclusive com potencial para fabricação de móveis (SERPA et al., 2003).

Serpa et al. (2003) comparando a madeira de *Eucalyptus saligna* com *Eucalyptus grandis* e *Pinus elliottii*, citam que a primeira apresentou maior densidade básica, contração volumétrica, resistência à flexão e à compressão.

Com relação às espécies de acácia, as mais plantadas no Brasil são a *Acacia mangium* e *Acacia mearnsii*. Santos et al. (2001) citam que a acácia-negra (*A. mearnsii*) devido ao seu rápido crescimento e aproveitamento integral da madeira (a casca é utilizada para extração de tanino e a madeira é utilizada para energia, celulose, e produção de painéis de madeira reconstituída), é uma excelente espécie para reflorestamento.

A *A. mearnsii* é plantada por milhares de pequenos produtores do Rio Grande do Sul, visando suprir as empresas de base florestal deste Estado (EMBRAPA, 2003).

De acordo com Schneider e Tonini (2003), a acacicultura tornou-se uma sólida atividade econômica, trazendo consideráveis benefícios para mais de quarenta municípios e milhares de famílias do gaúchas, tornando nosso país autosuficiente em extratos curtientes a partir de 1954.

Por ser leguminosa (Fabaceae), a *A. mearnsii* tem um importante caráter ecológico, pois realiza simbiose com microrganismos fixadores de nitrogênio atmosférico, o que a torna uma espécie apta também, para a restauração de áreas degradadas (EMBRAPA, 2003).

3.2 DAMPING-OFF

Os reflorestamentos de eucalipto e acácia-negra são realizados com mudas produzidas em viveiros especializados, que podem ser feitas por via seminal ou clonagem.

A obtenção de um reflorestamento de qualidade começa com a obtenção de boa muda, a qual deve seguir uma série de parâmetros. Wendling et al.

(2002) citam, dentre os vários fatores possíveis de qualidade de mudas, a ausência de pragas e doenças nas folhas, no caule e nas raízes.

Grigoletti Júnior et al. (2001) afirmam que para se obter sucesso na produção de mudas florestais, é necessário especial atenção aos fatores responsáveis pelo aparecimento de doenças, pois de acordo com estes autores, os viveiros reúnem uma série de condições ambientais que, associadas à fisiologia do hospedeiro, favorecem a instalação e o desenvolvimento de pragas e doenças.

Assim, o aprimoramento de técnicas para solucionar problemas no desenvolvimento e manejo de espécies florestais, como para a redução de doenças em viveiros, é de suma importância quando se quer obter mudas de qualidade (MUNIZ et al., 2007).

As doenças que mais comumente acometem as mudas em viveiros florestais são: o tombamento de mudas, a podridão de raízes, as ferrugens e as manchas foliares (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

O tombamento de mudas ou *damping-off* é causada por fungos que atacam o colo das mudas originadas de sementes, desde os estádios iniciais de germinação, a qual pode em poucos dias ocasionar a morte das plântulas (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

Dentre os agentes causais mais comuns deste tipo de doença, estão os fungos dos gêneros *Pythium*, *Rhizoctonia* e *Phytophthora* (BEDENDO, 2011). Porém em mudas de eucalipto, além destes, têm os gêneros *Cylindrocladium* e *Fusarium* (SANTOS; AUER; GRIGOLETTI JÚNIOR, 2001).

Santos et al. (2001a), avaliando os fungos patogênicos presentes em um lote de sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii*), encontraram agentes potenciais de causarem danos às plântulas no viveiro, os fungos *Botrytis*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* e *Cylindrocladium*.

O fungo *Rhizoctonia solani* Kuhn é anamorfo do Basidiomiceto *Thanatephorus* (CUBETA; VILGALYS, 1997), sendo considerado parasita primitivo e não especializado, capaz de causar podridões de sementes e tombamentos de pré e pós-emergência em várias culturas em condições ambientais muito amplas (MICHEREFF et al., 2005).

A utilização de medidas de controle contra agentes causadores de *damping-off*, incluindo aquelas contra o fungo *R. solani*, estão relacionadas com a

redução do inóculo do patógeno, a promoção do rápido desenvolvimento da plântula e no controle do ambiente favorável ao patógeno (BEDENDO, 2011).

Dentre as medidas preventivas para o controle deste tipo de doença em viveiros florestais, está na escolha adequada do local de instalação do viveiro; na desinfestação do solo com fungicidas; no tratamento das sementes com produtos registrados para este fim; na escolha do substrato e na utilização de material de cobertura (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

A assepsia com hipoclorito de sódio a 1% durante 5 minutos em sementes de acácia (*Cassia multijuga*), angico-vermelho (*Parapiptadenia rigida*), canafístula (*Peltophorum dubium*), maricá (*Mimosa bimucronata*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*), de acordo com Muniz et al. (2007), traz efeitos positivos na fase inicial de emergência das plântulas, melhorando a qualidade sanitária e o desenvolvimento.

Entretanto a desinfecção com estes tipos de produtos é apenas na parte superficial da semente, podendo não trazer efeitos de acordo com a espécie ou substrato. Vanzolini et al. (2010) citam que em pinhão-manso (*Jatropha curcas*) mesmo com a utilização de hipoclorito de sódio a 2%, a incidência de patógenos foi alta.

Sales Jr. et al. (2005) citam que há tendência na agricultura para proteção das sementes contra patógenos radiculares, com agroquímicos, devido ao alto custo das mesmas e pelo fato de que pequenas quantidades de ingredientes ativos protegem a germinação e a emissão das primeiras raízes. Entretanto, em viveiros florestais as condições são diferenciadas, Alfenas et al. (2009) citam que as frequentes irrigações lavam o princípio fungitóxico aplicado, além do fato de não existirem fungicidas registrados para as culturas.

Maffia et al. (2005) descrevem que *R. solani*, agente causador de tombamento de plântulas medicinais, não deve ser controlado por produtos químicos, apenas por práticas culturais.

Para produção de mudas de goiabeira, medidas usadas para evitar o tombamento de plântulas causado pelo fungo *R. solani* são: drenar a área, evitar excesso de regas, escolher locais bem ensolarados e aplicar fungicidas em intervalos regulares (JUNQUEIRA et al., 2001).

Além do controle químico e cultural, o controle biológico vem sendo testado e utilizado na proteção de plantas contra o *damping-off*. Pesquisando-se o

controle do tombamento de mudas de pepinos causados pelo patógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, Ethur et al. (2005) citam que a utilização de agentes antagonistas, como o fungo *Trichoderma* spp., pode ser considerada como alternativa viável. Lucon et al. (2009) selecionando isolados de *Trichoderma* spp. no controle de *R. solani*, encontraram raças com eficiência superior a 85% de controle do patógeno.

Além de fungos, algumas bactérias podem ser também agentes antagonistas, como as descritas por Lucon et al. (2008), no qual identificou um isolado de *Pseudomonas fluorescens* capaz de controlar o tombamento causado por *Pythium aphanidermatum* em plântulas de pepino.

O tratamento de sementes e do solo com produtos naturais em substituição aos agroquímicos, também é alternativa que vem sendo estudada. Dhingra et al. (2004) observaram que o tratamento do solo de viveiro com óleo essencial extraído de sementes de mostarda (*Brassica rapa*), pode ser alternativa ao uso do brometo de metila para o controle do patógeno *R. solani*.

Benchimol et al. (2006) verificaram que a utilização de casca de caranguejo-do-mangue (*Ucides cordatus*) reduziu a fusariose em pimenta-do-reino causada por *Fusarium solani* f. sp. *piperis*.

Visconti et al. (2010), em seu trabalho afirmaram que hidrolisado de peixe, pode ser utilizado para o controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espatífilio.

A adição de lodo de esgoto no solo aumentou a supressividade para o controle de tombamento causado por *Phytophthora nicotianae* em plântulas de limão cravo (*Citrus lemonia*), devido ao aumento da condutividade elétrica e inibição do crescimento do micélio do patógeno, além de promover a atividade microbiana do solo, como a de fungos e actinomicetos antagonistas (VELAZCO, 2002).

Em condições *in vitro*, Cunico et al. (2006) citam que extratos brutos etanólicos e aquosos de *Ottonia martiana* tiveram ação antifúngica contra os patógenos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum acutatum* e especialmente contra *Rhizoctonia* sp.

Mieth (2007) estudou o potencial de extratos vegetais na melhoria das qualidades sanitárias e fisiológicas de sementes florestais, utilizando o extrato de hortelã (*Mentha piperita*) para o tratamento de sementes de cedro (*Cedrela fissilis*), obtendo-se diminuição da incidência da maioria dos fungos, utilizando-se extratos em pó na concentração de 20% e, destilado, com concentrações de 20 a 30%.

Camargo (2007) utilizou extrato bruto, macerado seco, destilado e óleo essencial das plantas citronela (*Cymbopogon winterianos*), eucalipto citriodora (*Corymbia citriodora*) e hortelã (*Mentha piperita*), no tratamento de sementes de pinus (*Pinus elliottii*), grápia (*Apuleia leiocarpa*) e timbaúva (*Enterolobium contortisiliquum*), onde observou que todos os tratamentos, de forma geral, diminuíram a incidência de fungos, independente da espécie florestal estudada, com obtenção de melhores resultados quando foi testado o óleo essencial.

Outro produto alternativo utilizado no controle de doenças de plântulas é a quitosana, que pode apresentar atividade fungistática e de indução de resistência, sendo discutida no item 3.4.

3.3 INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA EM PLANTAS A PATÓGENOS

Durante o processo de evolução, as plantas têm adquirido resistência natural às doenças. A proteção natural das plantas está baseada em uma série de barreiras pré e/ou pós-formadas (TAIZ; ZEIGER, 2004). Os fatores pré-formados estão presentes na planta antes do seu contato com o patógeno, já os pós-formados podem surgir após o contato da planta com o patógeno, sendo que em ambas as categorias, os fatores podem ser estruturais ou bioquímicos (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

As plantas podem ter seu sistema de defesa induzido, é o fenômeno da resistência induzida, que se trata da ativação dos mecanismos latentes por meio de agentes externos bióticos ou abióticos (BEDENDO; MASSOLA Jr.; AMORIM, 2011) sem alteração do genoma da mesma (Cavalcanti et al., 2005 apud PASCHOLATI, 2011).

A indução de resistência das plantas contra fitopatógenos através da ativação da defesa natural traz como vantagens, o caráter sistêmico, pois além de ser persistente e natural da proteção, tem efetividade contra fungos, bactérias, vírus, nematóides e insetos; estabilidade através da ação de vários mecanismos; e em plantas suscetíveis há presença de potencial genético para resistência (PASCHOLATI; TOFFANO, 2007).

A ativação da defesa natural das plantas pode ser feita por compostos denominados elicitores, os quais podem ser de origem microbiana (elicitor exógeno) ou da própria planta (elicitor endógeno) (PASCHOLATI; LEITE, 1995).

Com relação à estrutura química, os elicitores são formados, no geral, por moléculas de natureza complexa, envolvendo carboidratos, glicoproteínas, polipeptídeos, enzimas ou lipídeos (PASCHOLATI, 2011).

Sticher et al. (1997) descrevem que os elicitores podem ser agentes bióticos ou abióticos, de natureza inorgânica, orgânica ou sintética.

Tavares et al. (2009) citam que a utilização de indutores bióticos e abióticos para indução de resistência de plantas de mamoeiro à podridão radicular causada por *Phytophthora palmivora*, tiveram efeitos positivos no controle da doença.

A indução de resistência provocada pelos elicitores nas plantas pode ser classificada como resistência local adquirida (RLA), resistência sistêmica induzida (RSI) e resistência sistêmica adquirida (RSA) (TERRY; JOYCE, 2004).

Os elicitores, como as infecções nas plantas causadas por fitopatógenos, acarretam mudanças no metabolismo primário, com ações diretas sobre o crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como causando alterações no metabolismo secundário (BERGER; SINHA; ROITSCH, 2007), com ação direta sobre a defesa vegetal.

O conhecimento de que as plantas podem pré-condicionar defesas contra pragas e doenças já é relatado há mais de cem anos (VALLAD; GOODMAN, 2004).

Kessmann et al. (1994) enfatizam o trabalho de Ray e Beauverie em 1901, os quais descreveram-no como primeiro relato de indução de resistência pelas plantas, aplicando-se esporos atenuados de *Botrytis cinerea* e relacionaram-no esta indução com as condições ambientais de cultivo. Esse estudo foi confirmado trinta anos mais tarde por Carbonne e Kalalyev, os quais mostraram que a resistência sistêmica adquirida depende da condição do hospedeiro. Segundo os mesmos autores, em 1933 Chester observou que plantas suscetíveis podiam adquirir resistência após o primeiro contato com o patógeno avirulento ou após inoculação com a forma atenuada do agente patogênico.

A partir destes trabalhos pioneiros, Terry e Joyce (2004) afirmam que várias pesquisas testando a indução de resistência das plantas à pragas e doenças

foram realizadas no mundo todo em várias culturas. Em 1970 foram desenvolvidos os primeiros estudos testando-se a indução de resistência das plantas no Brasil, realizando-se no Instituto Biológico de São Paulo, onde a Dra. Walkyria B. C. Moraes testou *Saccharomyces cerevisiae*, goma xantana, *Bacillus thuringiensis* e uredosporos inativados de *Hemileia vastatrix* na indução de resistência contra *Hemileia vastatrix* em cafeeiro (BONALDO; PASCHOLATI; ROMEIRO, 2005).

A resistência nas plantas quando induzida envolve genes que podem ativar vários mecanismos na prevenção a organismos patogênicos (MÉTRAUX, 2007). Em resposta ao ataque local é frequentemente expressa de forma sistêmica aos órgãos ainda não danificados, por meio do transporte vascular de metabólitos de sinalização ou até mesmo compostos voláteis (HEIL; TON, 2008).

Os genes de resistência estão associados com o incremento do ácido salicílico (AS), ácido jasmônico (AJ) e etileno (ET) (FEYS; PARKER, 2000; JALALI; BHARGAVA; KAMBLE, 2006). O AS está associado à RSA, pois é considerado sinalizador de certas proteínas relacionadas à patogenicidade (GRÜNER et al., 2003; GLAZEBROOK, 2005). A RSI não está associada com a ativação dos mesmos genes da RSA, sendo independente do ácido salicílico, mas dependente para sua ativação, dos níveis de AJ e ET (FEYS; PARKER, 2000; BOSTOCK, 2005).

A RSA pode ser conceituada como mecanismo de defesa induzida por agentes bióticos ou abióticos ou infecção localizada por patógenos, que confere proteção à planta contra amplo espectro de microrganismos (DURRANT; DONG, 2004) de forma sistêmica (VLOT; KLESSIG; PARK, 2008), a qual uma vez estabelecida pode durar semanas, sendo seu grau de proteção variável em função da concentração do indutor, do inóculo utilizado, do intervalo de tempo entre o tratamento inicial com indutor e o contato com o patógeno, das condições de temperatura e luminosidade (GUZZO, 2004), do agente utilizado para inoculação e do tamanho da necrose ocorrida em função da inoculação do patógeno (STICHER et al., 1997).

O AS produzido localmente ou sistemicamente na planta é responsável pela ativação da RSA (BOSTOCK, 2005), o qual, de acordo com Sobrinho et al. (2005), atua como molécula sinal, desencadeando respostas locais e sistêmicas de defesa, com ação de inibição da catalase e na modificação do balanço redox celular. Anand et al. (2008) descrevem que a aplicação de ácido salicílico em culturas de

Agrobacterium tumefaciens, agente causal da galha da coroa, diminuiu o crescimento da colônia bacteriana, sua virulência e o ataque às células da planta.

A RSA têm como respostas mais conhecidas a síntese de fitoalexinas e de proteínas-RPs, sendo que as fitoalexinas atuam localmente e as proteínas além da atuação local, agem de forma sistêmica na planta (HEIL; BOSTOCK, 2002).

Dentre os mecanismos envolvidos na RSA estão a resposta de hipersensibilidade (LEE; LEON; RASKIN, 1995; DURRANT; DONG, 2004); alterações na estrutura da planta, como lignificações, caloses e papilas (STICHER et al., 1997); acúmulo de proteínas relacionadas à patogenicidade (LEE; LEON; RASKIN, 1995; DURRANT; DONG, 2004); fenilpropanóides, produtos do metabolismo secundário, como fitoalexinas e compostos fenólicos (LEE; LEON; RASKIN, 1995) e, ativação de enzimas chaves como as peroxidases e a fenilalanina amônia-liase (FAL) (CAVALCANTI; BRUNELLI; STANGARLIN, 2005).

As proteínas-RPs mais pesquisadas no estudo da RSA são as β -1,3-glucanases (PR-2) e as quitinases (PR-3), que possuem atividade hidrolítica, quebrando polímeros estruturais presentes nas paredes dos patógenos. As plantas quando são tratadas com indutores de resistência, aumentam sua atividade de proteínas (LABANCA, 2002).

Boava et al. (2010), estudando a influência do indutor abiótico acibenzolar-S-metil no controle da ferrugem do eucalipto, causada por *Puccinia psidii*, encontrou aumento na concentração de quitinases nos tratamentos com a utilização deste produto. Couto et al. (2009), avaliando a utilização de indutores de resistência em algodoeiro à murcha de fusário, verificaram aumento de peroxidases e quitinases nas folhas tratadas com metil jasmonato.

A enzima mais estudada nos trabalhos para avaliação da RSA no metabolismo secundário vegetal é a fenilalanina amônia-liase (FAL), a qual situa-se entre o metabolismo primário e secundário, sendo que sua reação catalisada regula a formação de vários compostos fenólicos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Fogolari (2010), avaliando o potencial de extratos a base de *Calendula officinalis* na indução de resistência pós-colheita de morangos verificou aumento da atividade da enzima FAL pela aplicação dos extratos de calêndula.

A utilização dos elicitores acibenzolar-S-metil e da proteína harpina em pós-colheita de pêssegos para o controle da podridão parda causada por *Monilinia*

fructicola, aumentou o teor de compostos fenólicos e da enzima FAL nos frutos (DANNER et al., 2008).

3.4. QUITOSANA NO CONTROLE DE DOENÇAS DE PLANTAS

A quitosana é um amino polissacarídeo, derivado da desacetilação da quitina, a qual constitui-se na maior parte dos exoesqueletos dos insetos, crustáceos e da parede celular dos fungos. É considerada, após a celulose, como composto orgânico mais importante da natureza (AZEVEDO et al., 2007). Esses autores citam ainda que a quitosana, por ser produto natural, de baixo custo, renovável, abundante e atóxico, proposto como material potencialmente atraente para usos diversos.

A produção de quitina é estimada em mais de um bilhão de toneladas anuais, a qual é retirada das carapaças de crustáceos que contêm cerca de 15 a 20% deste material. A quitina possui estrutura polimérica constituída predominantemente de unidades repetidas de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose, que é muito semelhante à celulose, diferenciando-se apenas pelo grupo hidroxila (OH) do C₂ de cada unidade glicosídica (MATHUR; NARANG, 1990).

Na desacetilação parcial da quitina em soluções alcalinas concentradas permite obter a quitosana, a qual é constituída de unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amido-2-desoxi-D-glicopiranoose. A maioria dos grupamentos acetamida (NHCOCH₃) na quitina, durante a reação de hidrólise alcalina, é transformado em grupo amino (NH₂) ao longo da cadeia polimérica. Este polímero é insolúvel em água, mas dissolve-se em soluções com ácido acético, ácido fórmico e ácidos minerais, tornando-se polieletrólito catiônico (MATHUR; NARANG, 1990).

A quitosana possui aplicações em várias áreas, como na alimentícia, biotecnologia, ciência dos materiais, tratamento de água, drogas e produtos farmacêuticos, agricultura, proteção ambiental e terapia genética (AZEVEDO et al., 2007), incluindo a propriedade de ter quase nenhuma toxicidade ao homem (RAMOS BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Na agricultura, seu emprego está tomando importância pela sua atividade antimicrobiana sobre grande variedade de fitopatógenos (EL GHAOUTH et al., 1992; EL GHAOUTH et al., 1997; BHASKARA REDDY et al., 2000;

DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004). Entretanto, o seu poder antimicrobiano depende de uma série de fatores, como o grau de desacetilização, peso molecular, pH do meio e temperatura (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

A quitosana, além de suas propriedades anti-microbianas e de indução de resistência, pode atuar no aumento da produção vegetal, através da aceleração do processo de mineralização da matéria orgânica; no aumento da fixação biológica de nitrogênio atmosférico, estimulando o aumento da simbiose de bactérias nodulíferas com a planta e por apresentar teor considerável de nitrogênio (RAMOS BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2011).

Porém, ainda não estão bem elucidados os mecanismos pelos quais ocorre a ação antimicrobiana da quitosana. Entretanto, há várias hipóteses, como a que defende que a aplicação do polímero causa alteração na permeabilidade celular devido à interação entre a quitosana (com característica policatiônica) e a superfície celular eletronegativa, o que desencadeia no desprendimento de eletrólitos e constituintes de proteínas de ação antimicrobiana (DEVLIEGHERE; VERMEULEN, DEBEVERE, 2004).

É provável também que a quitosana cause mudanças morfológicas e estruturais, desorganizando as moléculas das células do patógeno (Hadwiger et al., 1986 apud PRAPAGDEE et al., 2007) podendo inibir o crescimento de alguns fungos (CIA; PASCHOLATI; BENATO, 2007).

Contudo, a indução de resistência é a hipótese mais provável da ação da quitosana nas plantas, pois ela age ligando-se a receptores que estão presentes na membrana celular das plantas, mimetizando assim o fenômeno de reconhecimento que ocorre pela interação incompatível entre a planta e o patógeno (LABANCA, 2002).

Cia et al. (2007) citam que o polímero pode induzir o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e elicitar a produção de fitoalexinas.

Na planta, a quitosana pode atuar na indução de resistência, aumentando-se as concentrações de ácido salicílico (SATHIYABAMA; BALASUBRAMANIAN, 1998), inibindo as proteinases, alterando-se o metabolismo das fitoalexinas, promovendo a lignificação (TERRY; JOYCE, 2004), induzindo a formação de compostos fenólicos (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2006), ativando as

enzimas quitinases e β -1,3-glucanases (EL GHAOUTH et al., 1992; ZHANG; QUANTICK, 1998), fenilalanina amônia-liase (ROMANAZZI et al., 2002) e peroxidase (ZHANG; QUANTICK, 1997).

A inibição de enzimas de desestruturação da parede celular sintetizada por fungos, como a poligalacturonase, pectinaliase e celulase, dos compostos tais como ácidos orgânicos (oxálico e fumárico) e toxinas específicas, como alternariol, também podem ser induzidas pela quitosana (BHASKARA REDDY et al., 1998).

A síntese de calose, a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a transcrição e a tradução de genes de defesa e a codificação de proteínas relacionadas à patogenicidade e fitoalexinas são respostas induzidas na planta pela aplicação de quitosana (AGRAWAL et al., 2002).

De uma forma geral, Devlieghere et al. (2004) citaram que a quitosana pode atuar de três formas distintas na proteção das plantas: primeiro inibindo o crescimento dos fungos, principalmente se estes possuírem quitina como constituinte principal da parede; induzindo a produção da enzima quitinase e por último elicitando a produção de fitoalexinas pela planta.

Na agricultura, principalmente em pós-colheita, várias pesquisas têm sido realizadas com a aplicação de quitosana. El Ghaouth et al. (2000) aplicaram quitosana em citros e observaram que o produto inibiu o crescimento do fungo *Penicillium digitatum*. Ainda com citros, Rapussi-da-Silva (2006) observou que a quitosana tem potencial para controle da mancha preta, causada pelo fungo *Guignardia citricarpa*.

Em maçãs, a aplicação de quitosana inibiu os fungos *Penicillium expansum* e *Botrytis cinerea* (EL GHAOUTH; SMILANICK; WILSON, 2000).

Em caqui reduziu-se a incidência e a severidade da podridão mole causada por *Rhizopus stolonifer*, sendo observado em teste *in vitro* que a concentração de 0,5% inibiu completamente o crescimento deste fungo (CIA et al., 2010).

Em frutos de mamão, houve significativa redução da severidade de antracnose (CIA, 2005). Em kiwi houve significativo controle de *Botrytis cinerea* (PAK et al., 1998).

Em videiras, testando em condições *in vitro* e a campo, Maia et al. (2010) concluíram que o polímero tem grande potencial no controle da antracnose e do míldio.

Em uvas controlou de forma eficiente o fungo *B. cinerea* durante a pós-colheita (ROMANAZZI et al., 2002). Também estudando a mesma fruteira, Camili et al. (2007) aplicaram solução com quitosana nos frutos observando-se que o polímero apresentou efeito fungistático sobre *B. cinerea*. No entanto, os autores enfatizaram que suas propriedades elicitoras requerem mais estudos conclusivos, devido ao fato de que quando aplicada antes da inoculação do fungo nos cachos, não houve efeito significativo do tratamento sobre o desenvolvimento da doença.

Maia et al. (2010) citam em seu trabalho que a quitosana tem grande potencial para controlar o fungo *Elsinoe ampelina*, causador de antracnose da videira.

A aplicação de quitosana em pêssegos durante a pós-colheita também reduziu as podridões nos frutos, quando utilizaram-se concentrações de 0,25 e 1% (MAZARO; GOUVEA; CITADIN, 2005).

Em morangos, aplicações de quitosana na pré e pós-colheita reduziram as podridões causadas por *B. cinerea* (BHASKARA REDDY et al., 2000). Além disso, a aplicação de quitosana em morangos também reduziu a mancha-demicosferela, mancha de dendrofoma e flor preta (MAZARO, 2007).

A redução nas podridões causadas por *B. cinerea* e *Rhizopus stolonifer* em morangos também foi observada por El Ghaouth et al. (1992), sendo seu efeito antimicrobiano observado até em frutos minimamente processados (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

Cerqueira et al. (2011) estudando o recobrimento de goiabas com filmes protéicos e de quitosana, verificaram que o polímero diminuiu o amadurecimento dos frutos armazenados em condições ambientais.

Cia et al. (2007) citam que existem evidências suficientes comprovando a eficiência da quitosana no controle de doenças originárias de infecções quiescentes em frutos.

Contudo, resultados positivos também estão sendo obtidos quando se aplica soluções com quitosana nas plantas frutíferas. Pereira et al. (2008) verificaram que extrato de quitosana de micélio de *Trichoderma* sp. e de *Rhizopus* sp., conferiram proteção parcial às plantas de cacaueteiro ao fungo *Verticillium dhaliae*, causador da murcha de verticílio.

Na olericultura, a podridão de raízes em pepino, causada por *Pythium aphanidermatum* foi controlada pela aplicação de quitosana, havendo indução de

respostas de defesas, como a indução de barreiras estruturais nos tecidos das raízes e do estímulo das hidrolases (quitinases e β -1-3-glucanases) tanto nas raízes como nas folhas (EL GHAOUTH et al., 1994).

Alface minimamente processada teve seu período de armazenamento prolongado por quatro dias após a aplicação de quitosana na pós-colheita (DEVLIEGHERE; VERMEULEN; DEBEVERE, 2004).

Em pimenta, o uso de quitosana causou danos citológicos severos a hifas de *B. cinerea*, o que inibiu a capacidade do patógeno em causar a doença (EL GHAOUTH et al., 1997).

No controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate, Mazaro et al. (2009) concluíram que o tratamento das sementes com quitosana nas concentrações de 1,1 e 2,5% apresentaram maior eficiência, além de induzir o aumento na atividade da enzima FAL respectivamente.

Tanada-Palmu et al. (2005) estudando o recobrimento de sementes de brócolis com coberturas de quitosana, relataram que a qualidade em termos de germinação e vigor não foi afetada.

As pesquisas com quitosana também têm sido feitas em grandes culturas, como amendoim, onde a mesma reduziu a germinação de uredosporos de *Puccinia arachidis*, o número de lesões, o diâmetro do halo de crescimento e a esporulação do fungo, além de aumentar a atividade das enzimas quitinase e β -1,3-glucanase e o aumento nas concentrações de ácido salicílico das folhas tratadas com este polímero (SATHIYABAMA; BALASUBRAMANIAN, 1998).

Na cultura da soja, concentrações de até 5 mg.L⁻¹ causaram efeito no crescimento de *Fusarium solani*. No entanto, somente as concentrações mais elevadas ocasionaram mudanças morfológicas nas hifas do fungo (PRAPAGDEE et al., 2007).

Na cultura do painço, o produto a base de quitosana, ElexaTM, foi aplicado nas sementes e na parte aérea do mesmo, o qual induziu a resistência das plantas a *Sclerotinia graminicola* (SHARATHCHANDRA et al., 2004).

Quando aplicada na parte aérea do feijoeiro-comum, a quitosana aumentou a atividade da enzima glucanase e apresentou propriedades antifúngicas contra o fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, podendo ser uma alternativa para o controle da antracnose causada por este patógeno (DI PIERO; GARDA, 2008).

Em plantas ornamentais, a quitosana também foi testada, como na cultura do crisântemo, onde Pinto et al. (2010) testaram-na pela aplicação através de pulverização na parte aérea da planta para controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysantemi*. Entretanto, devido aos resultados variáveis obtidos, não foi possível obter resposta padrão, o que fez com que os autores concluíssem a necessidade para realização de novos estudos com concentrações maiores do polímero ou com produtos de diferentes graus de acetilação e polimerização do que o utilizado no trabalho realizado.

Nas plantas medicinais os trabalhos realizados com quitosana aumentaram a biossíntese do óleo essencial metil chavicol de manjeriço (*Oncimum basilicum* L.) e também as atividades específicas das enzimas chavicol *O*-metil transferase e da FAL (DESCHAMPS, 2002). Dongming et al. (2011) com aplicações foliares de quitosana incrementaram a biossíntese de artemisinina da planta *Artemisia annua* L.

A quitosana apresentou também potencial bactericida, conforme observado por Chung et al. (2003) em teste *in vitro* com *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além disso, No et al. (2002) também verificaram o efeito da quitosana sobre quatro bactérias gram-negativas e sete gram-positivas.

Na área florestal, especialmente com as espécies dos gêneros *Eucalyptus* e *Acacia*, não há relatos na literatura de trabalhos testando-se as propriedades antifúngicas e de indução de resistência a doenças com quitosana, especialmente, para o tratamento de sementes visando proteger as plântulas dos agentes causadores de *damping-off*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Fitossanidade e na Unidade de Ensino e Pesquisa Viveiro Florestal, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos – PR, em 2011.

4.1 EXPERIMENTO I: EFEITO FUNGISTÁTICO *IN VITRO* DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA SOBRE *R. solani*

O isolado do fungo *R. solani* foi obtido no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco/PR. No Laboratório de Fitossanidade da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, o mesmo foi repicado em placas de Petri®, contendo meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar), mantendo-se as mesmas em B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12 horas.

As parcelas do experimento, foram constituídas por placas de Petri® de vidro com 9 cm de diâmetro. O experimento foi realizado com cinco tratamentos, envolvendo as concentrações de quitosana de: 0; 0,25; 0,5; 1 e 2%. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com cinco repetições.

A quitosana utilizada no experimento foi adquirida de farmácia de manipulação.

Os meios de cultura dos tratamentos tiveram a quitosana incorporada aos mesmos, através de pré-aquecimento em forno microondas até a temperatura aproximada de 40°C , além da adição de ácido acético a 1%. Após, o meio de cultura recebeu a quitosana, em agitador eletromagnético para homogeneizar a mistura. Depois de homogeneizado o pH dos meios de cultura foi corrigido para o valor de 5,5, com a utilização de hidróxido de sódio 0,1N.

A esterilização foi primeiramente realizada através de autoclave a 120°C durante 20 minutos, no entanto, a quitosana queimava. Então foi testado e obtendo sucesso a esterilização em banho-maria por uma hora, à temperatura aproximada de 100°C , não ocorrendo desta forma a queima da quitosana.

A seguir os meios de cultura foram vertidos na quantidade de 18 mL por placa de Petri®, na câmara de fluxo laminar. As placas sem tampa foram em seguida submetidas a tratamento de esterilização dentro da câmara de fluxo laminar, através de utilização de luz ultra-violeta, durante o período de 20 minutos.

Após a esterilização e solidificação do meio, as placas de Petri® receberam discos com 10 mm de diâmetro (Figura 1), contendo o micélio do fungo *R. solani*. Posteriormente, as placas com o micélio do fungo foram tampadas e lacradas com papel filme e transferidas para incubadora B.O.D. e mantidas à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

A avaliação do experimento foi feita 48; 72 e 96 horas após a incubação em B.O.D., com a utilização de medição cruzada em centímetros de dois diâmetros (A e B) pré-definidos antes do crescimento micelial do fungo. Este experimento foi finalizado quando a primeira placa de Petri® teve suas bordas atingidas pelo crescimento micelial do fungo *R. solani*.

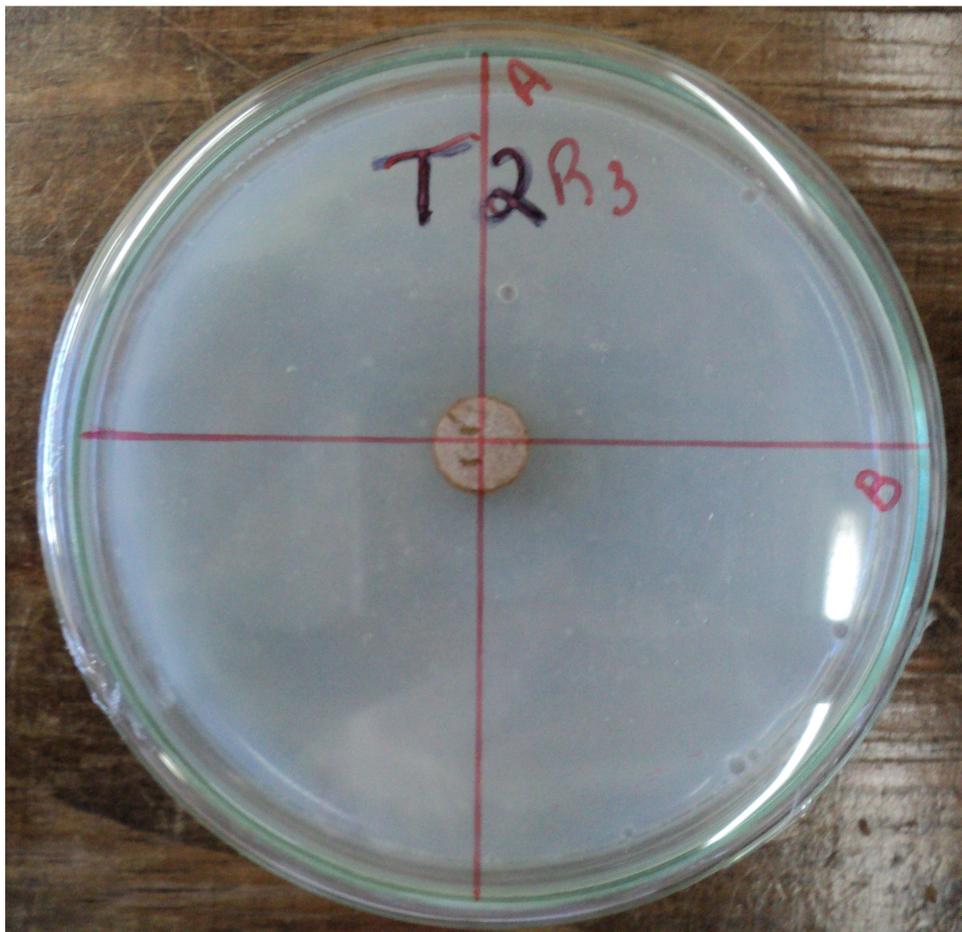


Figura 1: Marcação dos diâmetros A e B utilizados para avaliar o experimento *in vitro*. UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

4.2. EXPERIMENTO II – EMERGÊNCIA, DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLÂNTULAS DE *E. saligna* COM AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA

O experimento foi realizado nos Laboratórios de Fitossanidade e Bioquímica e na Unidade Ensino e Pesquisa Viveiro Florestal da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos.

Os tratamentos aplicados envolveram nas concentrações de quitosana de: 0; 0,25, 0,5; 1,0 e 2,0%. A quitosana utilizada no experimento foi obtida em farmácia de manipulação, sendo dissolvida em ácido acético a 1%, seguindo diluição com água destilada para obter as concentrações a serem testadas. As sementes foram imersas na solução de quitosana e então, semeadas em tubetes contendo o substrato composto por Plantmax Florestal®.

Antes de receber as sementes o substrato foi previamente esterilizado em autoclave por 1 hora a 120°C, e então inoculado com *R. solani*.

Os inóculos de *R. solani* foram preparados a partir de isolados do mesmo micélio utilizado para o experimento *in vitro*, de onde se obteve culturas puras desenvolvidas em placas de Petri® de 9 cm de diâmetro com tampa, contendo meio BDA. As placas foram mantidas em estufa incubadora tipo B.O.D. a 23°C e fotoperíodo de 12 horas. Discos dessa cultura pura foram inoculados em sementes de sorgo previamente autoclavadas, sendo mantidos em incubadora B.O.D.

Essas sementes de sorgo contaminadas com *R. solani* foram utilizadas como veículo contaminante ao substrato esterilizado, na proporção de 10 g.Kg⁻¹. O inóculo foi incorporado ao substrato três dias antes de receber as sementes.

Tubetes de polipropileno com capacidade de 50 cm³ receberam o substrato contaminado e foram colocados em estufa da Unepê Viveiro Florestal. Cada repetição foi constituída por 25 tubetes (Figura 2), aonde cada tubete recebeu uma semente tratada com quitosana.

As sementes de *E. saligna* utilizadas no experimento, foram retiradas de uma matriz do município de Dois Vizinhos/PR, sendo limpas de impurezas antes de serem tratadas com quitosana.

A irrigação na estufa da Unepê Viveiro Florestal foi realizada através de aspersão, sendo que foram feitas avaliações diárias da umidade relativa e da temperatura do ar com auxílio de aparelho termohigrômetro. A umidade relativa do ar do interior do ambiente para o experimento ficou em 70,8% com desvio padrão de 18,2%. E a temperatura do ar ficou em média 25,4°C com desvio padrão de 6,8°C.

O experimento foi conduzido durante 28 dias, sendo que as primeiras plântulas de *E. saligna* começaram a emergir em 7 dias.

As variáveis analisadas neste experimento foram as seguintes: índice de velocidade de emergência (IVE), emergência (%), tombamento de pós-emergência

(%), comprimento do caulículo e da radícula e a produção de massa de matéria fresca.

O índice de velocidade de emergência (IVE) foi calculado até o oitavo dia após o início da emergência das plântulas, equivalente ao décimo quinto dia após a semeadura, quando a maior parte das plântulas havia emergido, através do método descrito por Popinigs (1977), descrito pela fórmula: $IVE = N_1/D_1 + N_2/D_2 + \dots + N_n/D_n$, onde N é igual ao número de plântulas emergidas no dia (1; 2; até n) e D o número de dias após a semeadura.

A porcentagem de emergência das plântulas foi avaliada ao término do experimento, calculando em porcentagem o stand final de cada unidade experimental.

O percentual de tombamento de pós-emergência das plântulas foi observado diariamente, e foi calculado com base no número de plantas que emergiram por parcela.

O comprimento em centímetros do caulículo e da radícula foram avaliados ao término do experimento, com utilização de régua graduada.

A produção de massa de matéria fresca total (parte aérea e raízes) das plântulas foi avaliada ao término do experimento. As raízes foram lavadas e as plântulas foram pesadas em balança de precisão, sendo esta variável obtida por plântula.

Para as análises bioquímicas foi coletada três amostras de plântulas por tratamento para cada variável bioquímica analisada. A amostra constitui-se de 0,5 g, mesclada entre todas as partes do vegetal (folhas, talo e raízes), as quais foram imediatamente após a coleta, congeladas e armazenadas em freezer a -20°C até as avaliações.

Determinou-se as variáveis bioquímicas teor de proteínas totais, a atividade da fenilalanina amônia-liase (FAL) e teor de compostos fenólicos dos tecidos vegetais.

Para avaliação da concentração de proteínas totais utilizou-se adaptação do método descrito por Bradford (1976), onde as amostras das plântulas de *E. saligna* foram maceradas em almofariz com 10 mL de tampão fosfato 0,2 M (pH 7,5). Em seguida, o material foi centrifugado (14.000 g por 10 minutos a 4°C) e o sobrenadante obtido pelo processo foi coletado e levado para leitura em espectrofotômetro marca NOVATÉCNICA, modelo UV – SP 2000 Spectrum a 630

nm, com soro albumina bovina como padrão. O reagente de Bradford utilizado para avaliar o teor de proteínas totais foi proveniente da SIGMA-ALDRICH.

Para avaliação da enzima FAL, as amostras armazenadas em freezer foram transferidas e maceradas em almofariz previamente gelado, onde acrescentou-se 6,0 mL do tampão de extração a 4°C, o qual foi preparado com mistura de 22,2 g de Tris (Tri hidroximetil-aminometano); 0,37 g de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético); 85,5 g de sacarose; 10 g de PVP (polivinilpirrolidiona), completando-se o volume para 1000 mL com água destilada e ajustando-se o pH para 8,0 com ácido clorídrico 2,0 N. Após a maceração em solução tampão, as amostras foram centrifugadas a 6000 g por 10 minutos a 4°C, sendo que o sobrenadante foi diluído pipetando-se 200 µL do mesmo e acrescentando-se 5 mL do tampão de extração.



Figura 2: Instalação do Experimento II no Viveiro Florestal da UTFPR Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

A atividade da FAL foi avaliada com base na diferença de absorvância resultante da conversão da fenilalanina em ácido trans-cinâmico (HYODO; KURADA; YANG, 1978). Pipetou-se 1,5 mL de cada extrato enzimático em tubos de ensaio, acrescentando-se 1,0 mL do tampão de extração e 0,5 mL de fenilalanina (49,6 mg. mL⁻¹) ou água destilada na prova em “branco”. Incubou-se a 40°C por uma hora a mistura, interrompendo-se a reação com banho de gelo e procedendo-se as leituras em espectrofotômetro a 290 nm (RODRIGUES; BEZERRA; COELHO, 2006).

A quantificação dos compostos fenólicos totais foi realizada em duas etapas, seguindo-se o método adaptado de Bielecki & Turner (1966). A primeira compreendeu-se a extração dos fenóis totais, realizada a partir da adição de 4 mL da solução metanol, clorofórmio e água (MCA) (6: 2,5: 1,5 v/v), sobre o material vegetal, seguido da trituração em almofariz do mesmo à temperatura ambiente e posterior centrifugação a 6000 g por 20 minutos, coletando-se o sobrenadante.

Posteriormente, foi realizada nova extração do resíduo remanescente, adicionando-se 4 mL de MCA, centrifugando-se novamente a 6000 g por 20 minutos, sendo o sobrenadante obtido adicionado ao primeiro, obtendo-se assim o extrato MCA. A esse extrato foi adicionado 1 mL de clorofórmio e 1,5 mL de água destilada, procedendo-se nova centrifugação a 6000 g por 15 minutos para separação das fases.

A segunda etapa compreendeu-se a determinação de fenóis totais realizada pelo método adaptado de Jennings (1981). A quantificação de fenóis foi feita através da curva padrão utilizando-se tirosina. As amostras foram preparadas a partir da retirada da alíquota de 0,5 mL da parte superior do tubo de extração dos fenóis (extrato MCA), adicionando-se em seguida 0,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu. Após 15 minutos, foram adicionados 5 mL do reagente alcalino “A” (preparado com carbonato de sódio a 2 % em solução de hidróxido de sódio (0,1 N), permanecendo-se durante 50 minutos, até a leitura da absorvância em 760 nm, por meio de uso de espectrofotômetro, modelo NOVATECNICA. O resultado foi expresso em mg.g⁻¹ de tecido fresco.

4.3 EXPERIMENTO III – EMERGÊNCIA, DESENVOLVIMENTO INICIAL E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLÂNTULAS DE *A. mearnssii* COM AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA

O experimento III (Figura 3) seguiu a mesma metodologia descrita para o experimento II, sendo avaliado para este, a espécie florestal *A. mearnssii*.

As sementes utilizadas foram oriundas do pomar de sementes da empresa Tanagro S.A. de Montenegro/RS e tiveram sua dormência tegumentar quebrada por meio do método descrito por Martins-Corder et al. (1999), aplicando-se imersão das mesmas em água quente na temperatura de 80°C por cinco minutos.

Após a quebra de dormência as sementes foram tratadas com soluções de quitosana com as mesmas concentrações testadas em *E. saligna* e plantadas na quantidade de três sementes por tubete.

O índice de velocidade de emergência para a *A. mearnssii* foi calculado para até 17 dias após a sementeira, quando a maior parte das plântulas já havia emergido do substrato.

A umidade relativa do ar do interior do ambiente para o experimento ficou em 58,1% com desvio padrão de 18,0%. E a temperatura do ar ficou em média 29,6°C com desvio padrão de 4,3°C.

O experimento foi conduzido até que as primeiras plântulas de *A. mearnssii* completassem 15 dias pós-emergência, ou seja, 22 dias após a sementeira.



Figura 3: Instalação do Experimento III no Viveiro Florestal da UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados das variáveis analisadas nos três experimentos foram submetidos à análise estatística, com auxílio do software ASSISTAT 7.6 BETA.

Primeiramente testou-se a normalidade dos dados por meio do Teste de Liliefors e de homogeneidade de variâncias pelo Teste de Bartlett. Os dados coletados em porcentagem como a variável porcentagem de emergência, não atenderam ao teste de normalidade, sendo assim transformados em $\arcsin \sqrt{x}$. Após transformação, os dados foram novamente submetidos ao Teste de Liliefors.

Os dados transformados e não transformados, atendendo assim aos pressupostos do modelo matemático, foram submetidos à análise de variância a 5% de probabilidade de erro.

Nas variáveis onde houve efeito significativo para os tratamentos, utilizou-se como teste complementar a análise de regressão, determinando-se assim modelos matemáticos para explicar o comportamento das variáveis com as concentrações de quitosana aplicadas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. EXPERIMENTO I: EFEITO FUNGISTÁTICO *IN VITRO* DE QUITOSANA SOBRE *R. solani*

Os resultados observados demonstraram efeito estatisticamente significativo das diferentes concentrações de quitosana sobre o fungo *R. solani* em cultivo *in vitro* (Figura 4). Esses resultados indicam efeito fungistático da quitosana sobre o patógeno, tendo-se maior supressão no crescimento micelial com aumento das concentrações de quitosana.

As curvas de regressões obtidas foram significativas a 1% de probabilidade de erro, sendo lineares decrescentes para as avaliações de 48 e 72 horas após a aplicação dos tratamentos e quadrática para análise realizada nas 96 horas.

A redução do crescimento micelial do patógeno seguiu a mesma tendência em todos os períodos avaliados (48, 72 e 96 horas após a aplicação dos tratamentos), sendo que no meio BDA com concentração de 2% de quitosana, a redução em relação ao tratamento testemunha (0%) foi maior que nas demais concentrações testadas, diminuindo-o em 51,9%, na avaliação de 48 horas.

No período de 48 horas, a concentração de quitosana estimada no presente trabalho para reduzir o crescimento micelial do patógeno em 50% (EC_{50}), foi de 1,93%, concentração menor que a necessária para inibir em 50% (EC_{50}) o crescimento micelial de *Colletotrichum* sp., que foi 2,28% (MUNOZ; MORET; GARCÉS, 2009). Já nas avaliações de 72 horas a EC_{50} encontrada foi a concentração de 2,88% e na de 96 horas (Figura 5) a EC_{50} ficou em 3,70%.

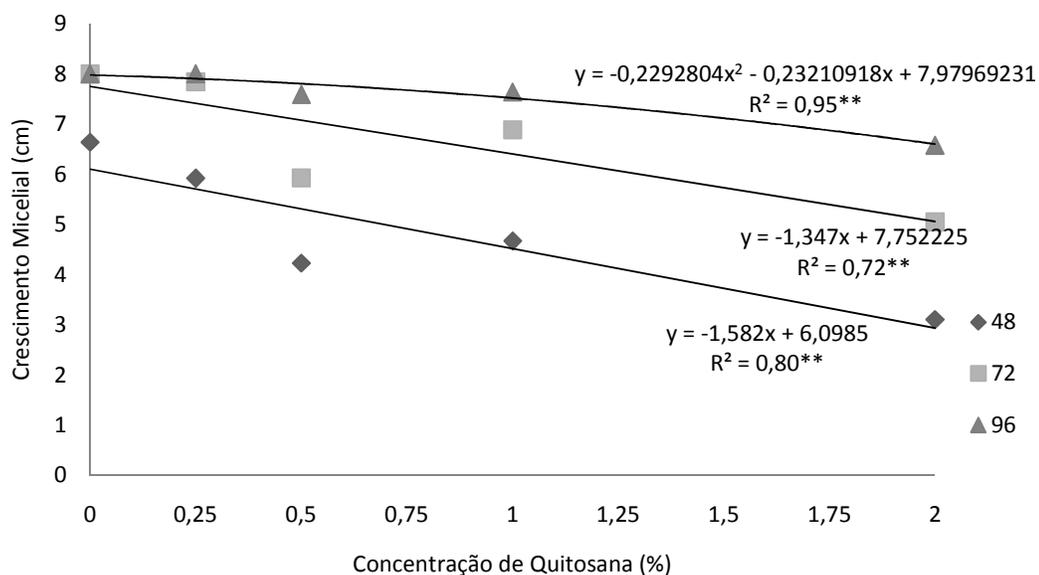


Figura 4: Efeito fungistático de cinco concentrações de quitosana no meio BDA, sobre *R. solani*, analisadas 48; 72 e 96 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. **Significativo a 1% de probabilidade.

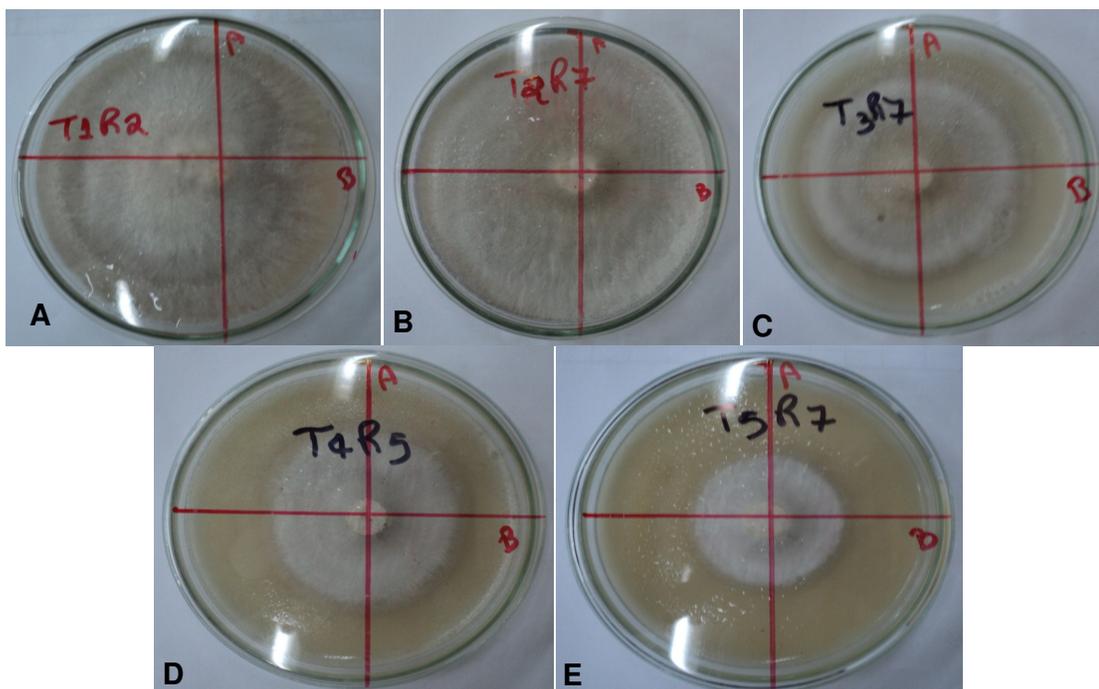


Figura 5: Detalhe da inibição do crescimento micelial de *R. solani* comparando as cinco concentrações de quitosana (A = 0%; B = 0,25%; C = 0,5%; D = 1% e E = 2%), na avaliação de 96 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

Para o fungo *Botrytis cinerea* houve inibição do crescimento micelial na concentração de 5% de quitosana, conforme relatado por Liu et al. (2007). Camili et al. (2007) citam que quitosana testada *in vitro* conferiu efeito fungistático com inibição total de *B. cinerea*, durante cinco dias de incubação, nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%.

Já o patógeno *Elsione ampelina* teve seu crescimento micelial reduzido em 57%, utilizando concentração de quitosana 0,016% (MAIA et al., 2010).

Di Piero e Garda (2008) relataram que o crescimento micelial de *Colletotrichum lindemuthianum* foi inibido com maior efeito na concentração de 0,3% de quitosana.

Botelho et al. (2010) estudaram a utilização de quitosana para controle *in vitro* de *Penicillium* sp. e observaram que aos 6 dias após a incubação, a concentração de 0,016% reduziu o crescimento do fungo em 34,2% comparado com a testemunha sem quitosana.

Rivero González et al. (2009) citam que a quitosana teve efeito fungistático na concentração de 0,1% sobre os fungos *Alternaria padwickii* e *Bipolaris oryzae*, causadores de danos nos grãos de arroz.

Possivelmente, o efeito fungistático da quitosana observado neste trabalho, seja pela presença da quitina, que é seu principal ingrediente ativo, no qual causa mudanças morfológicas e estruturais, desorganizando as moléculas das células do patógeno (Hadwiger et al., 1986 Apud PRAPAGDEE et al., 2007), e com isso inibe o crescimento do fungo (CIA; PASCHOLATI; BENATO, 2007).

5.2. EXPERIMENTO II – DESENVOLVIMENTO INICIAL E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE PLÂNTULAS DE *E. saligna* COM AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA

A análise de variância para a porcentagem de emergência das plântulas de *E. saligna* (APÊNDICE 04) demonstrou que não houve diferença significativa entre as concentrações de quitosana.

Tanada-Palmu et al. (2005) estudando o efeito da cobertura de sementes de duas olerícolas com quitosana, não observaram efeito da mesma sobre

capacidade germinativa e sobre vigor de brócolis e no vigor de sementes de salsa. Porém, houve efeito negativo sobre a germinação de sementes de salsa.

Observa-se na Figura 6 que a equação que se ajustou para explicar a tendência do IVE de *E. saligna* foi quadrática, com ponto de máxima de 1,30 para concentração de 0,94% de quitosana. Além disso, verificou-se que houve valores abaixo de 0,8, resultado obtido na concentração 0% de quitosana, o que pode ser efeito fitotóxico da mesma sobre as sementes.

Deseja-se que os valores de IVE para sementes seja o maior possível, uma vez que quanto mais lenta for a emergência das plântulas, mais tempo estas estarão expostas a microrganismos patogênicos, havendo assim, maior probabilidade de ocorrer *damping-off* nas mudas (CAMPOS et al., 2009).

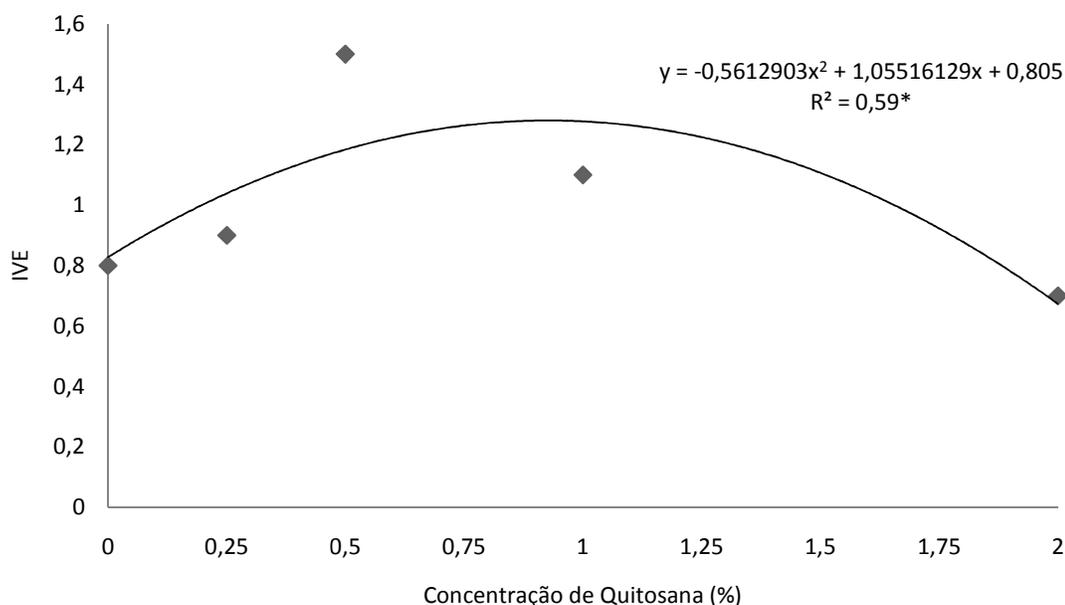


Figura 6: Índice de Velocidade de Emergência (IVE) de plântulas de *E. saligna*, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, quinze dias após a semeadura, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. *Significativo ao nível 5% de probabilidade de erro.

O controle do tombamento para *E. saligna* não obteve resposta significativa com o tratamento das sementes com quitosana (APÊNDICE 06), independente da concentração testada.

Mazaro et al. (2009) avaliaram o efeito da utilização de quitosana no tratamento de sementes de beterraba e tomate para o controle de tombamento de

mudas causado pelo fungo *Rhizoctonia* sp., observando que o polímero reduziu a incidência do problema, com maior eficiência para as concentrações entre 1,1% a 2,5%.

Com relação à altura das plântulas de *E. saligna*, aos 21 dias após a emergência, não diferiram estatisticamente entre si de acordo com as concentrações utilizadas (APÊNDICE 07). Resultado semelhante foi encontrado por Mazaro et al. (2009), onde a altura de plântulas de beterraba não foi influenciada pelo tratamento das sementes com quitosana.

Porém, o comprimento radicular foi influenciado pelo tratamento das sementes com quitosana (Figura 7), obtendo-se a maior e menor média nas concentrações de 0,33% e 1,52% de quitosana.

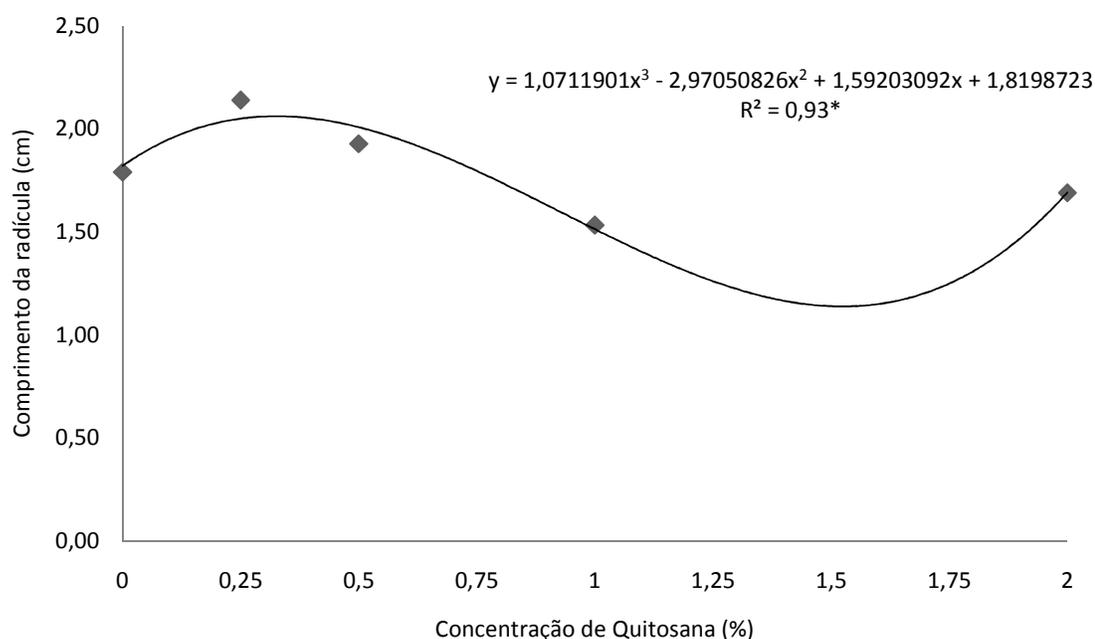


Figura 7: Comprimento da radícula de plântulas de *E. saligna* com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Para produção de mudas em viveiros florestais, um dos parâmetros de controle de qualidade a ser observado pelos viveiristas é o sistema radicular bem desenvolvido (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002), com isso, o uso da aplicação de quitosana em sementes de *E. saligna* deve ser cuidadoso, uma vez que observou-se certa faixa de concentração prejudicial para o desenvolvimento

radicular (Figura 7). Ressalta-se porém que este estudo foi realizado em um único ciclo, necessitando-se para resultado mais conclusivo a repetição do mesmo em outro período.

Para massa da matéria fresca das plântulas de *E. saligna*, observou-se pela análise de variância (APÊNDICE 09) que as concentrações de quitosana não apresentaram-se significativas pelo teste F. Mazaro et al. (2009) citam que plântulas de beterraba tiveram maior produção de massa de matéria fresca quando as sementes foram tratadas com concentrações de quitosana acima de 0,5% e em tomate utilizando concentrações maiores que 2%.

Nas análises bioquímicas dos tecidos vegetais das plântulas de *E. saligna*, a concentração de 2% de quitosana não pode ser avaliada, pela baixa quantidade de material vegetal produzido.

Observou-se que o teor de proteínas, bem como, de compostos fenólicos das plântulas de *E. saligna* não foi influenciado pelas concentrações de quitosana nas sementes, pois na análise de variância não houve efeito estatístico das mesmas (APÊNDICES 10 e 12).

Embora os teores de proteínas e de compostos fenólicos, dos tecidos vegetais das plântulas de *E. saligna* não terem sido influenciados pelas coesentranças de quitosana aplicadas nas sementes, o teor da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) foi estatisticamente influenciado pelos mesmos, conforme observado na Figura 8, o que demonstrou que o polímero pode ter atuado como elicitador, induzindo resistência sistêmica nas plântulas. De acordo com Cia et al. (2007) a quitosana tem mostrado ser efetiva na ativação de respostas nos tecidos vegetais, induzindo o acúmulo de proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) e elicitando a produção de fitoalexinas.

Mazaro et al. (2009) estudando o efeito de quitosana no tratamento de sementes visando o controle de tombamento de plântulas em beterraba e tomate, verificaram que o agente indutor interferiu nas atividades bioquímicas foliares de açúcares totais e redutores, proteínas totais e na atividade da enzima FAL, sendo este último também obtido para o presente trabalho. A maior eficiência técnica do tratamento das sementes com quitosana para os maiores teores da enzima FAL foram encontrados em plântulas de beterraba e tomate nas concentrações de 1,1% e 2,5%, respectivamente.

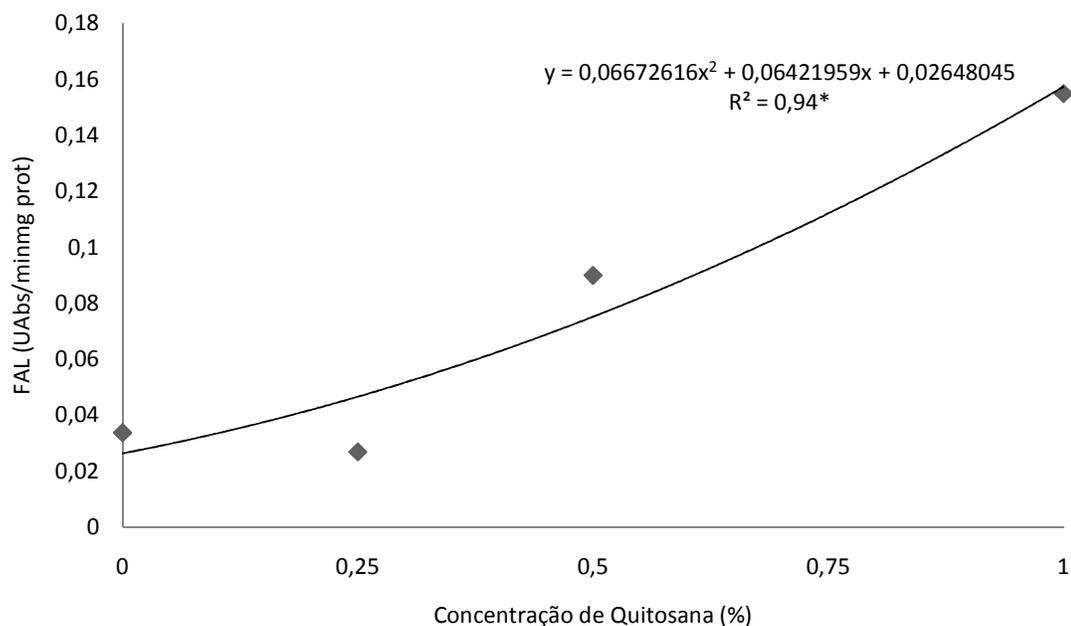


Figura 8: Teor de FAL de plântulas de *E. saligna* originárias de sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Fazendo-se análise conjunta entre as variáveis analisadas pode-se verificar que o uso de quitosana em concentrações de até 1% pode ter efeito não prejudicial ao vigor e desenvolvimento inicial das plântulas de *E. saligna*. Bem como, nessa concentração, bioquimicamente ocorreu expressiva atividade da enzima FAL, o que demonstrou ativação do metabolismo de defesa vegetal pelo uso da quitosana.

5.3. EXPERIMENTO III – DESENVOLVIMENTO INICIAL E COMPORTAMENTO BIOQUÍMICO DE PLÂNTULAS DE *A. mearnsii* COM AS SEMENTES TRATADAS COM QUITOSANA

De acordo com a análise de variância para a porcentagem de emergência das plântulas de *A. mearnsii*, não houve efeito significativo das concentrações de quitosana aplicadas nas sementes (APÊNDICE 13).

A porcentagem de emergência ficou em média 41,7% para todo o experimento, valor bem abaixo obtido por Roversi et al. (2002), o qual foi de 81,0% com imersão em água quente a 90°C e também abaixo de 84,0% que é o resultado obtido por Martins-Corder et al. (1999), com imersão em água quente a 80°C.

A hipótese mais provável da baixa emergência neste experimento é a de que a inoculação do substrato com o micélio de *R. solani* seja a responsável pelo baixo índice de emergência do experimento, causando tombamento de pré-emergência nas plântulas. Martins-Corder e Borges Júnior (1999) estudando a desinfestação e quebra de dormência de *A. mearnsii*, explicam que a principal causa da ausência de germinação em sementes que tiveram quebrada sua dormência, foi a presença de fungos e bactérias nos propágulos.

As plântulas de *A. mearnsii* começaram a emergir no sétimo dia após terem sido semeadas, e o IVE foi uma variável onde as concentrações de quitosana aplicadas não foram significativas (APÊNDICE 14). O IVE médio para o experimento ficou em 2,4.

Contudo, o tratamento das sementes de *A. mearnsii* com quitosana teve influência significativa sobre a incidência de tombamento das plântulas, obtendo-se a menor média (16,98%) com uso de 0,79% de quitosana (Figura 9). Goulart (2002) estudando o efeito de diferentes fungicidas no tratamento de sementes de algodoeiro para controle de tombamento de plântulas causado por *R. solani*, encontrou valores de *damping-off* superiores aos encontrados neste trabalho, utilizando as misturas de fungicidas: Carboxin+thiram+benomyl (30,2% de tombamento) e Thiram+thiabendazole+difenoconazole (46,9%).

Observou-se que na utilização de concentrações de quitosana acima de 1,58%, o tombamento de plântulas aumentou consideravelmente, o que pode ser explicado pelo fato destas apresentarem menor vigor (Figuras 10 e 11), o que as torna mais suscetíveis ao ataque de patógenos, de acordo com Bedendo (2011).

Com relação a altura das plântulas e comprimento da radícula de *A. mearnsii*, verificou-se efeito significativo da aplicação de quitosana nas sementes (Figuras 10 e 11). Observou-se em ambas (Figuras 10 e 11) que a equação que melhor se ajustou para explicar a relação entre o tratamento das sementes de *A. mearnsii* para altura das plântulas e comprimento da radícula, aos 15 dias após a emergência, foi polinomial quadrática.

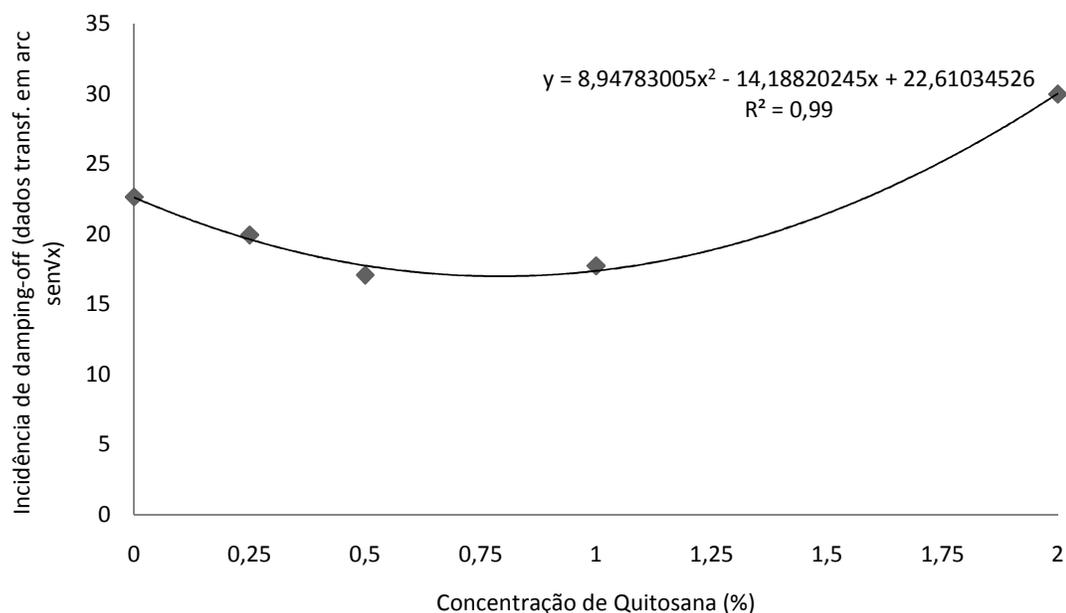


Figura 9: Incidência de *damping-off* em plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro. Dados transformados em arc sen $\sqrt{x}/100$.

A maior altura de plântulas de *A. mearnsii* (2,28 cm) ocorreu com uso de 0,88% de quitosana nas sementes (Figura 10). Já Mazaro et al. (2009) encontraram maior altura de plântulas de tomateiro quando as sementes foram tratadas com concentrações acima de 2% de quitosana.

Para comprimento da radícula das plântulas de *A. mearnsii* obteve-se a maior média (11,60 cm) com o uso de 0,63% de quitosana nas sementes (Figura 11). Mazaro et al. (2009) observaram que os tratamentos nas sementes de beterraba e tomate utilizando as concentrações entre 2% e 4% foram as que proporcionaram maior crescimento radicular, principalmente por estarem relacionados com a diminuição da incidência de tombamento das plântulas. Esta hipótese pode ter certa relação com o presente trabalho, pois a concentração onde houve o menor percentual de tombamento foi a de 0,79% de quitosana.

Bedendo (2011) afirma que a promoção do rápido desenvolvimento da plântula é uma medida de controle do *damping-off*, pois possibilita maior absorção de água e nutrientes, além da maturação dos tecidos jovens, tornando-a mais resistente aos patógenos, o que é observado neste trabalho, plantas com maior altura e comprimento da radícula, estão na faixa onde houve menor incidência da doença.

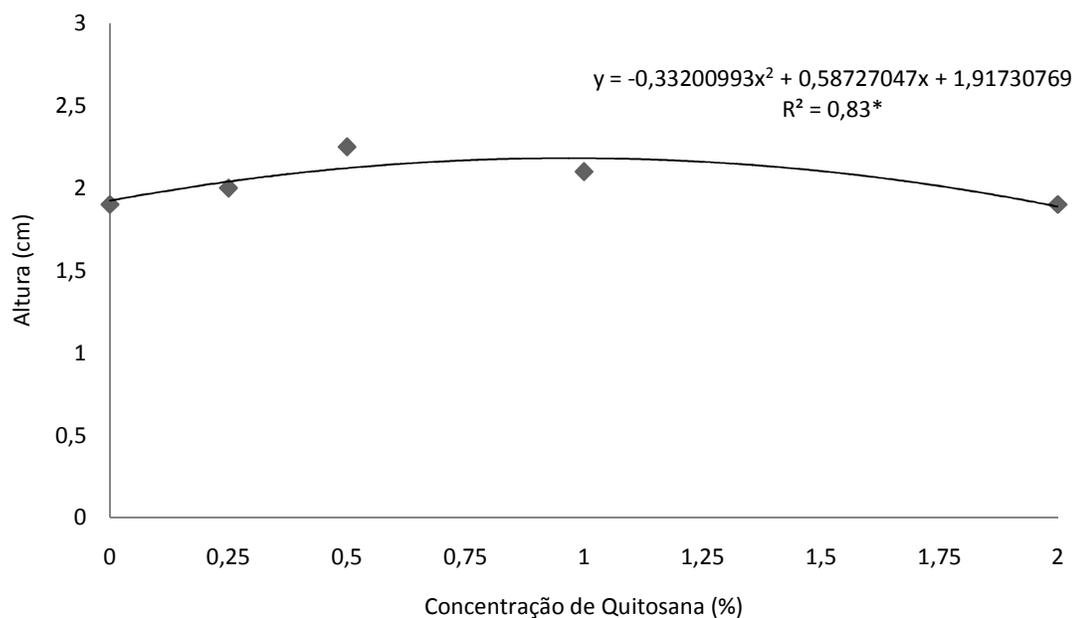


Figura 10: Altura de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. **Significativo ao nível de 1% de probabilidade de erro.

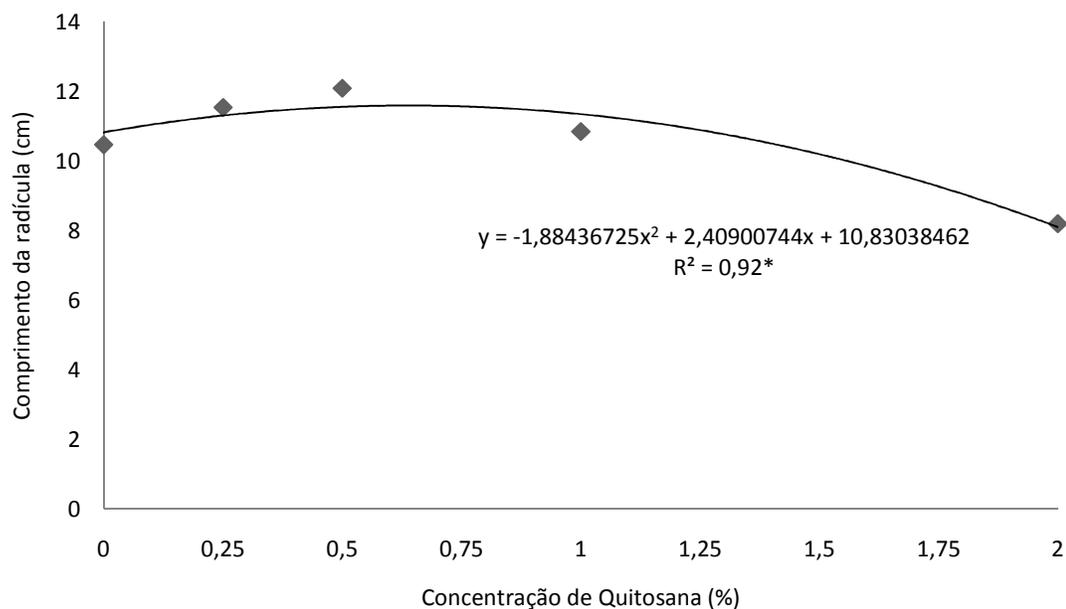


Figura 11: Comprimento da radícula de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

Campos et al. (2009) estudaram o efeito do tratamento químico de sementes de mamão visando ao controle de tombamento de *R. solani*, onde observaram que os tratamentos que reduziram ou atrasaram a emergência, foram os que apresentaram maior percentual de plântulas mortas em pós-emergência. Os autores explicam que o motivo de maior percentual de *damping-off* é o fato de que os tratamentos promoveram retardo ao escape da doença e da disponibilidade de tecido suscetível ao patógeno.

A massa de matéria fresca das plântulas de *A. mearnsii* 15 dias após a emergência não foi influenciada significativamente pelas concentrações de quitosana aplicadas nas sementes (APÊNDICE 18). Entretanto, Mazaro et al. (2009) encontraram influência significativa na utilização do polímero, com ganho de massa de matéria fresca em beterraba e tomate, sendo que no último, quando as sementes foram tratadas com concentrações acima de 2% de quitosana, o resultado foi maior.

O teor de proteínas dos tecidos vegetais de *A. mearnsii* foi influenciado pelas concentrações de quitosana aplicadas nas sementes (Figura 12), obtendo-se comportamento linear crescente com o aumento da concentração do agente indutor.

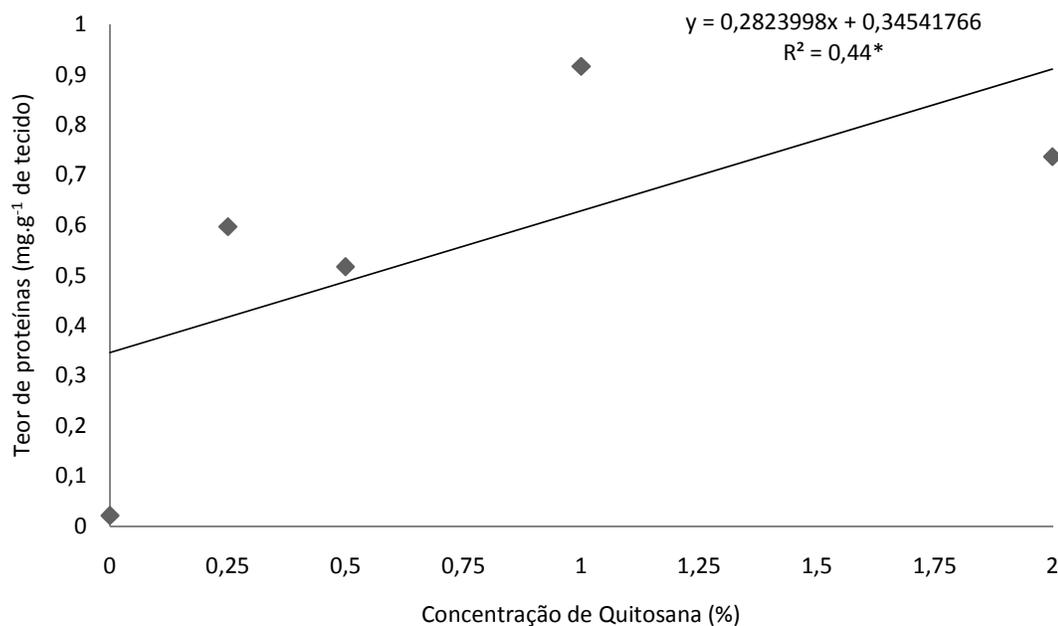


Figura 12: Teor de proteínas (mg.g⁻¹ de tecido) de plântulas de *A. mearnsii*, oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011. *Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

O trabalho de Mazaro et al. (2009) corrobora com os resultados obtidos para *A. mearnsii*, uma vez que estes autores observaram que o uso da quitosana em sementes de beterraba aumentou o teor protéico das plântulas. No entanto, este efeito foi verificado somente quando as sementes foram tratadas com concentrações acima de 1%.

Para o teor da enzima fenilalanina amônia-liase (FAL) houve influencia significativa do uso de quitosana nas sementes de *A. mearnsii*, obtendo comportamento linear crescente com o aumento da concentração utilizada (Figura 13). Mazaro et al. (2009) verificaram aumento da atividade da FAL em plântulas de beterraba e tomate com as sementes tratadas com quitosana. Di Piero e Garda (2008) verificaram aumento na atividade de glucanases em plantas de feijoeiro pelo tratamento das folhas com quitosana.

Os maiores teores protéicos das plântulas podem indicar que houve um maior desenvolvimento das mesmas pela ação da quitosana, entretanto, pode-se aceitar a hipótese de indução de resistência, pois de acordo com Pascholatti (2011), proteínas-RP (proteínas relacionadas à patogênese), podem ser produzidas por tecidos em respostas a ação de agentes elicitores endógenos e exógenos, o que corrobora com os resultados do experimento, indicando que a quitosana pode ser um indutor para a *A. mearnsii*.

Entretanto, a hipótese de indução de resistência não pode ser elucidada, pois o teor de fenóis totais, não foi afetado significativamente pela aplicação de quitosana nas sementes de *A. mearnsii* com quitosana (APÊNDICE 21). De acordo com Taiz e Zeiger (2004), a FAL está situada em um ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o secundário, sendo que a reação que ela catalisa, regula a formação de muitos compostos fenólicos.

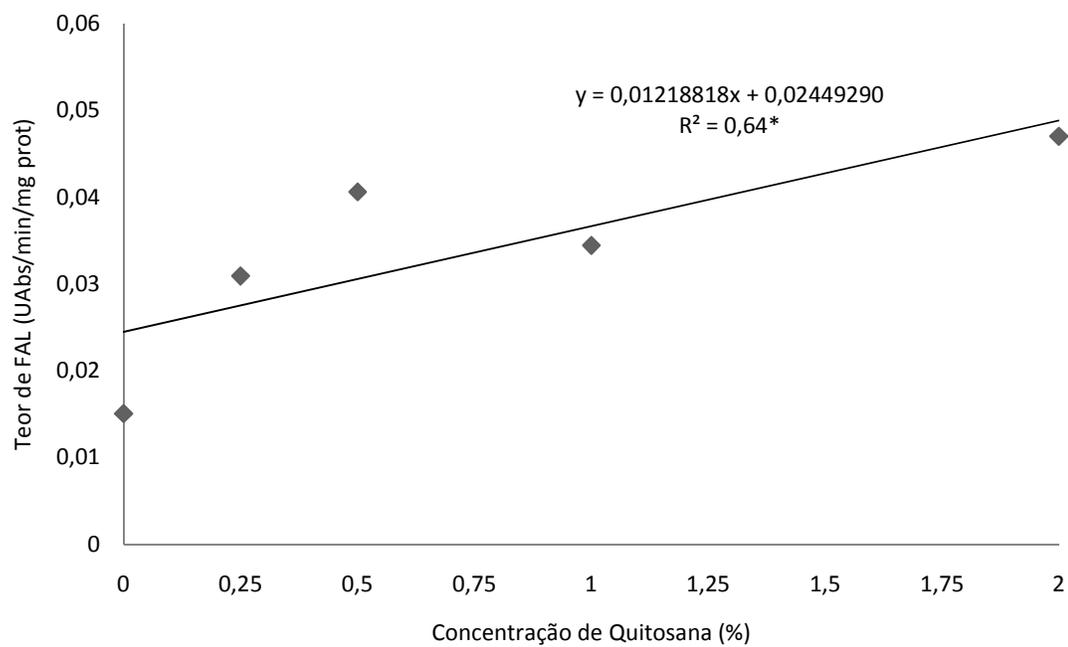


Figura 13: Teor de FAL de *A. mearnsii* com as sementes tratadas com diferentes concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

*Significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro.

6 CONCLUSÕES

A quitosana apresentou efeito fungistático potencial sobre *Rhizoctonia solani*, quando aplicada *in vitro*.

A quitosana quando aplicada em sementes de *Eucalyptus saligna* interferiu na atividade da enzima FAL, o que não resultou para menor incidência de tombamento.

O uso de concentrações de quitosana entre 0,6% e 0,9% nas sementes de *Acacia mearnsii*, foram favoráveis para redução do tombamento e para o maior desenvolvimento inicial das plântulas, recomendando-se esta faixa para a espécie.

Bioquimicamente, a quitosana, demonstrou capacidade de alteração do teor de proteínas dos tecidos vegetais da *Acacia mearnsii* e da capacidade de ativação da enzima FAL de ambas as espécies, o que significa uma indução do metabolismo secundário para a produção de compostos de defesa vegetal, devendo se assim testá-la para outras espécies de fungos patogênicos que prejudicam o *Eucalyptus saligna* e a *Acacia mearnsii*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Novos estudos com quitosana *in vitro*, devem ser realizados com outros patógenos causadores de tombamento de mudas, buscando-se evidenciar o potencial fungistático do polímero no controle deste grupo de doenças de plantas.

Sugere-se em trabalhos futuros a aplicação via foliar no viveiro, analisando-se concentrações e frequência de aplicações.

Neste sentido, deve-se ao realizá-los, levar em consideração aspectos nutricionais do substrato e das sementes, pois ambos são úteis para o desenvolvimento inicial e para defesa vegetal.

Análises enzimáticas mais detalhadas devem ser incluídas nos trabalhos futuros, como a quantificação de PRPs – quitinases e glucanases.

Além disso, análises moleculares também devem ser incluídas em trabalhos vindouros, uma vez que permitem avaliar genes ativados pelos agentes indutores.

REFERÊNCIAS

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. **Anuário Estatístico da ABRAF 2011 ano base 2010**. Brasília, 2011, 130p.

AGRAWAL, Ganesh Kumar et al. Chitosan activates defense/stress response(s) in the leaves of *Oryza sativa* seedlings. **Plant Physiology and Biochemistry**, Paris, v. 40, n. 12, p. 1061-1069, 2002.

ALFENAS, Acelino Couto et al. **Clonagem e Doenças do Eucalipto**, 2. Ed., Viçosa: UFV, 2009, 484p.

ANAND, Ajith et al. Salicylic acid and systemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*. **Plant Physiology**, Waterbury, v. 146, n. 2, p. 703-715, 2008.

ARYA, Arun, Recent Advances in Management of Fungal Pathogens of Fruit Crops. P. 3-13. In: **Management of Fungal Plant Pathogens**. Ed.: ARYA, Arun; PERELLÓ, Analia Edith. London, Library of Congress Catalog, 2010, 388p.

AZEVEDO, Valéria Vital Cordeiro de et al. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural commodities. **Crop Protection**, Oxford, v. 25, p. 108-118, 2006.

BEDENDO, Ivan Paulo. *DAMPING-OFF*. In: AMORIM, Lilian; REZENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIN FILHO, Armando. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 22. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 435-441, 2011.

BEDENDO, Ivan Paulo; MASSOLA Jr., Nelson S.; AMORIM, Lilian, Controles Cultural, Físico e Biológico de Doenças de Plantas. In: AMORIM, Lilian; REZENDE, Jorge Alberto Marques; BERGAMIN FILHO, Armando. **Manual de Fitopatologia 1: Princípios e Conceitos**. Cap. 17. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 367-388, 2011.

BENCHIMOL, Ruth Linda; SUTTON, John C.; DIAS-FILHO, Moacir B., Potencialidade da casca de caranguejo na redução da incidência de fusariose e na promoção do crescimento de mudas de pimenteira-do-reino. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 2, p. 180-184, 2006.

BERGER, Susanne; SINHA, Alok K.; ROITSCH, Thomas, Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**, Oxford, v. 58, n. 15 – 16, p. 4019-4026, 2007.

BHASKARA REDDY, M. V. et al. Effect of chitosan on growth and toxin production by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. **Biocontrol Science Technology**, New York, v. 8, p. 33-43, 1998.

BHASKARA REDDY, M. V. et al. Effect of preharvest chitosan sprays in post-harvest infections by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 20, p. 39-51, 2000.

BIELESKI, R. L.; TURNER, N. A., Separation and estimation of amino acids in crude plant extracts by thin-layer electrophoresis and chromatography. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 17, p. 278-293, 1966.

BOAVA, Leonardo P. et al. Atividade de quitinases e peroxidases em folhas de eucalipto em diferentes estágios de desenvolvimento após tratamento com acibenzolar-S-metil (ASM) e inoculação com *Puccinia psidii*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 2, p. 124-128, 2010.

BONALDO, S. M.; PASCHOLATI, S. F.; ROMEIRO, R. S. **Indução de resistência: noções básicas e perspectivas**. In: CAVALCANTI, L. S. et al. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 11-28, 2005.

BOSTOCK, Richard M., Signal crosstalk and induced resistance: Straddling the between cost and benefit. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p. 545-580, 2005.

BOTELHO, Renato Vasconcelos; MAIA, Aline José; RICKLI, Edinei Hartmann; LEITE, Carla Daiane; FARIA, Cacilda Márcia Duarte Rios, Quitosana no controle de *Penicillium* sp. na pós colheita de maçãs. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 5, n. 2, p. 200-206, 2010.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, Elsevier, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL, **Florestas do Brasil**. Ministério do Meio Ambiente, Brasília, 2009, 124p.

BROOKER, Ian **Botany of the eucalypts**. In: The Genus *Eucalyptus*. Cap. 1. London: Taylor & Francis, p. 11-43, 2002.

CAMARGO, Rodrigo Fernandes de, **Tratamentos Alternativos na Qualidade Sanitária e Fisiológica de Sementes de Espécies Florestais**. 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria/RS, 2007.

CAMILI, Elisangela Clarete et al. Avaliação de quitosana, aplicada em pós-colheita, na proteção de uva 'Itália' contra *Botrytis cinerea*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 33, n. 3, p. 215-221, 2007.

CAMPOS, Sílvia C. et al. Tratamento químico de sementes de mamão visando ao controle de *Rhizoctonia solani*. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 3, p. 192-197, 2009.

CAVALCANTI, L. S.; BRUNELLI, K. R.; STANGARLIN, J. R. Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência induzida. In: CAVALCANTI, L. S. et al. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos**. Piracicaba: FEALQ, p. 81-124, 2005.

CERQUEIRA, Thales Sandoval et al. Recobrimento de goiabas com filmes proteicos e de quitosana. **Bragantia**, Campinas, v. 70, n. 1, p. 216-221, 2011.

CHUNG, Y. C. et al. Effect of abiotic factors on the antibacterial activity of chitosan against waterborne pathogens. **Bioresource Technology**, Essex, v. 88, n. 3, p. 179-184, 2003.

CIA, Patrícia **Avaliação de agentes bióticos e abióticos na indução de resistência e no controle pós-colheita de antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) em mamão (*Carica papaya*)**. 2005, 187f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

_____, Patrícia; PASCHOLATI, Sérgio Florentino; BENATO, Eliane Aparecida. Indução de resistência no manejo de doenças pós-colheita. In: RODRIGUES, Fabrício Ávila; ROMEIRO, Reginaldo da Silva. **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Cap. 11. Viçosa: UFV, p. 245-280, 2007.

_____, Patrícia et al. Quitosana no controle pós-colheita da podridão mole em caqui 'rama forte'. **Bragantia**, Campinas, v. 69, n. 3, p. 745-752, 2010.

COUTO, Erick F. et al. Avaliação de indutores de resistência em algodoeiro a murcha de fusário: atividade enzimática e índice de infecção. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 34, n. 5, p. 352-356, 2009.

CUBETA, M. A.; VILGALYS, R., Population Biology of the *Rhizoctonia solani* Complex. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 87, n. 4, p. 480-484, 1997.

CUNICO, Mirian M. et al. Atividade antifúngica de extratos brutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. **Visão Acadêmica**, Cidade de Goiás, v. 7, n. 2, 2006, disponível em: <<http://coracoralina.ueg.br/revista>>, acesso em novembro de 2011.

DANNER, Moeses Andriago et al. Indução de resistência a podridão parda em pêssegos pelo uso de eliciadores em pós-colheita. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 7, p. 793-799, 2008.

DESHCAMP, C. **Regulation of essential oil biosynthesis in basil (*Oncium basilicum* L.)**. 2002, 151f. Thesis, Purdue University, Purdue, 2002.

DEVLIEGHERE, F.; VERMEULEN, A.; DEBEVERE, J. Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. **Food Microbiology**, Amsterdam, v. 21, p. 703-714, 2004.

DHINGRA, Onkar D. et al. Utilização de óleo essencial de mostarda no controle de tombamento e requeima causadas por *Rhizoctonia solani* em viveiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 6, p. 683-686, 2004.

DI PIERO, Robson Marcelo; GARDA, Marcos Venicius, Quitosana reduz a severidade da antracnose e aumenta a atividade de glucanase em feijoeiro-comum. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 9, p. 1121-1128, 2008.

DONGMING, Ma et al. Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 176-182, 2011.

DURRANT, W. E.; DONG, X., Systemic Acquired Resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 42, p. 185-209, 2004.

EL GHAOUTH, Ahmed et al. Antifungal activity of chitosan on two postharvest pathogens of strawberry fruits. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 82, p. 398-402, 1992.

_____, Ahmed et al. Effect of chitosan on cucumber plants: suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 84, n. 3, p. 313-320, 1994.

_____, Ahmed et al. Biochemical and cytochemical aspects of the interaction of chitosan and *Botrytis cinerea* in bell pepper fruit. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 12, p. 183-194, 1997.

_____, Ahmed; SMILANICK, Joseph L.; WILSON, Charles L. Enhancement of the performance of *Candidasaitoana* by the addition of glycolchitosan for the control of postharvest decay of apple and citrus fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 19, n. 1, p. 103-110, 2000.

EMBRAPA, **Cultivo da acácia-negra**. In: Sistemas de Produção 3, versão eletrônica, disponível em <<http://www.sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br>> acesso em outubro de 2011.

ETHUR, Luciana Z. et al. Fungos antagonistas a *Sclerotinia sclerotiorum* em pepineiro cultivado em estufa. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 30, n. 2, p. 127-133, 2005.

FEYS, Bart J.; PARKER, Jane E., Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends in Genetics**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 449-455, 2000.

FOGOLARI, Hoilson, **Potencial de extratos à base de *Calendula officinalis* L. na indução de resistência e no efeito fungistático à *Botrytis cinerea*, in vitro.** 55f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Área de Concentração: Produção Vegetal), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2010.

GLAZEBROOK, Jane, Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 43, p 205-227, 2005.

GOULART, Augusto C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodão com fungicidas no controle do tombamento de plântulas causado por *Rhizoctonia solani*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 4, p. 399-402, 2002.

GRIGOLETTI JÚNIOR, Albino; AUER, Celso Garcia; SANTOS, Álvaro Figueredo dos, **Estratégias de manejo de doenças em viveiros florestais. Circular Técnica 47**, EMBRAPA, CNPF-Colombo, 8p., 2001.

GRÜNER, Rose et al. Salicylic acid and the hypersensitive response initiate distinct signal transduction pathways in tobacco that converge on the as-1-like element of the PR-1a promoter. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 270, p. 4876-4886, 2003.

GUZZO, Sylvia Dias, **Aspectos bioquímicos e moleculares da resistência sistêmica adquirida em cafeeiro contra *Hemileia vastatrix*.** 2004, 236f. Tese de Doutorado (Doutorado em Agronomia). Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

HEIL, Martin; BOSTOCK, Richard M., Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defences. **Annals of botany**, London, v. 89, p. 503-512, 2002.

_____, Martin; TON, Jurriaan, Long-distance signalling in plant defence. **Trends in Plant Science**, Elsevier, v. 13, n. 6, p. 264-272, 2008.

HYODO, Hiroshi; KURODA, Hiroyuki; YANG, Shang Fa, Induction of phenylalanine ammonia-lyase and increase in phenolics in lettuce leaves in relation to the development of russet spotting caused by ethylene. **Plant Physiology**. Rockville, v.62, p.31-35, 1978.

JALALI, B. L.; BHARGAVA, S.; KAMBLE, A., Signal transduction and transcriptional regulation of plant defence responses. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 154, p. 65-74, 2006.

JENNINGS, A. C., The determination of dihydroxy phenolic compounds in extracts of plant tissues. **Analytical Biochemistry**, Orlando, v. 118, p. 396-398, 1981.

JUNQUEIRA, Nilton Tadeu Vilela et al. **Doenças da Goiabeira no Cerrado**. Circular Técnica 15, EMBRAPA Cerrados, Planaltina, 2001, 32p.

KESSMANN, H. et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 32, p. 439-459, 1994.

LABANCA, Elaine Regina Godoy, **Purificação parcial de elicitores presentes em *Saccharomyces cerevisiae*: atividade como indutores de resistência em pepino (*Cucumis sativus*) contra *Colletotrichum lagenarium* e da síntese de gliceolinas em soja (*Glycine max*)**. 2002, 107f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

LEE, H. I.; LEON, J.; RASKIN, I., Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 92, p. 4076-4079, 1995.

LIU, Jia et al. Effects of chitosan on control of postharvest diseases and physiological responses of tomato fruit. **Postharvest and Biology Technology**, Elsevier, v. 44, n. 3, p. 300-306, 2007.

LUCON, Cleusa Maria Mantovanello; AKAMATSU, Milena Apetitu; HARAKAVA, Ricardo, Promoção de crescimento e controle de tombamento de plântulas de pepino por rizobactérias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 6, p. 696-697, 2008.

LUCON, Cleusa Maria Mantovanello et al. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 225-232, 2009.

MACHADO, Carlos Cardoso; SILVA, Elizabeth Neire da; PEREIRA, Reginaldo Sérgio. O Setor Florestal Brasileiro e a Colheita Florestal. In: MACHADO, Carlos Cardoso. **Colheita Florestal**. Cap. 1, Viçosa: UFV, p. 15-42, 2008.

MAFFIA, Reginaldo G. et al. Queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais causada por *Rhizoctonia solani* AG1 – 1B. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 3, p. 302-306, 2005.

MAIA, Aline José et al. Ação de quitosana sobre o desenvolvimento de *Plasmopora viticola* e *Elsinoe ampelina*, *in vitro* e em videiras cv. Isabel. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 3, p. 203-209, 2010.

MARTINS-CORDER, Maisa Pimentel; BORGES, Rosito Zepenfeld; BORGES JUNIOR, Norton, Fotoperiodismo e quebra de dormência em sementes de acácia-negra (*Acacia mearnsii* De Wild.). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 71-77, 1999.

MARTINS-CORDER, Maisa Pimentel; BORGES JÚNIOR, Norton, Desinfestação e quebra de dormência em sementes de *Acacia mearnsii* De Wild. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 9, n. 2, p. 1-7, 1999.

MATHUR, N. K.; NARANG, C. K. Chitin and chitosan, versatile polysaccharides from marine animals. **Journal of Chemical Education**, Easton, v. 67, n. 11, p. 938-942, 1990.

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

_____, Sérgio Miguel; GOUVEA, Alfredo; CITADIN, Idalmir Qualidade pós-colheita de pêssegos cv. Flôr da Prince em função da aplicação de quitosana em condições ambientais. In: Congresso Ibero-americano de Tecnologia Pós-colheita e Agroexportação, 4., 2005, Porto Alegre, **Anais eletrônicos...** 1 CD-ROM, 2005.

_____, Sérgio Miguel et al. Controle do tombamento de plântulas de beterraba e tomate pelo tratamento de sementes com quitosana. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1424-1430, 2009.

MÉTRAUX, Jean-Pierre. **Induced Defenses in Plants**. In: RODRIGUES, Fabrício Ávila; ROMEIRO, Reginaldo da Silva. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos. Cap. 1. Viçosa: UFV, p. 7-24, 2007.

MICHEREFF, Sami J. et al. Importância dos patógenos e das doenças radiculares em solos tropicais. In: MICHEREFF, Sami J.; ANDRADE, Domingos E. G. T.; MENEZES, Maria. **Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais**. Cap. 1. Recife: UFRPE, p. 1-18, 2005.

MIETH, Angelina, Microflora e qualidade fisiológica de sementes de cedro (*Cedrela fissilis*) tratadas com extrato natural de hortelã (*Mentha piperita*). **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 1192-1195, 2007.

MORA, Admir Lopes; GARCIA, Carlos Henrique, **A Cultura do Eucalipto no Brasil**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Silvicultura (SBS), 2000, 111p.

MUNIZ, Marlove Fátima Brião; SILVA, Lorenzo Melo e; BLUME, Elena, Influência da assepsia e do substrato na qualidade de sementes e mudas de espécies florestais. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 140-146, 2007.

MUNOZ, Z.; MORET, A.; GARCÉS, S., Assesment of chitosan for inhibition of *Colletotrichum* sp. tomatoes and grapes. **Crop Protection**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 36-40, 2009.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 74, p. 65-72, 2002.

PAK, H. A. et al. Soft fungicides for the control the *Botrytis cinerea* *in vitro* and *in vivo* on kiwifruit. **Proc. 51st N. Z. Plant Protection Conference**, Christchurch, p. 123-129, 1998.

PASCHOLATI, Sérgio Florentino; LEITE, Breno. Hospedeiro: Mecanismos de Resistência. In: BERGAMIN FILHO, Armando; KIMATI, Hiroshi; AMORIM, Lilian, **Manual de Fitopatologia I: Princípios e Conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 417-453, 1995.

_____, Sérgio Florentino; TOFFANO, Leonardo. Indução de Resistência contra Fitopatógenos em Espécies Arbóreas. In: **Indução de Resistência em Plantas a Patógenos**. Cap. 3. Viçosa: UFV, p. 59-66, 2007.

_____, Sérgio Florentino. Fisiologia do Parasitismo: Como as Plantas se Defendem dos Patógenos. In: **Manual de Fitopatologia I: Princípios e Conceitos**. Cap. 35. São Paulo: Agronômica Ceres, p. 593-636, 2011.

PEREIRA, Ricardo Borges et al. Ativação de defesa em cacaueteiro contra a murcha-de-verticílio por extratos naturais e acibenzolar-S-metil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2, p. 171-178, 2008.

PINTO, Zayame Vegette; BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat, Efeito de casca de camarão, hidrolisado de peixe e quitosana no controle da murcha de *Fusarium oxysporum* f. sp. *chrysanthemi* em crisântemo. **Tropical Plant Pathology**, Brasília, v. 35, n. 1, p. 16-23, 2010.

POPINIGS, F., **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1977, 329p.

PRAPAGDEE, Benjaphorn et al. The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by *Fusarium solani* f. sp. *glycines*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 98, n. 7, p. 1353-1358, 2007.

RAMOS BERGER, Lucia R.; STAMFORD, Thayza Ch. Montenegro; STAMFORD, Newton Pereira, Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, Bilbao, v. 12, n. 4, p. 195-215, 2011.

RAPUSSI-DA-SILVA, M. C. C. **Efeito da quitosana e da radiação UV-C no controle de *Guignardia citricarpa* em laranja pós-colheita**. 2006, 82f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura. "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

RIVERO GONZÁLEZ, Deyanira et al. Actividad antifúngica *in vitro* de la quitosana sigma frente a hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). **Fitosanidad**, Cuba, v. 13, n. 2, p. 101-107, 2009.

RODRIGUES, Antonia Alice C.; BEZERRA NETO, Egídio; COELHO, Rildo S. B. Indução de resistência a *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* em caupi: eficiência de indutores abióticos e atividade enzimática elicitada. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 31, n. 5, p. 492-499, 2006.

ROMANAZZI, G. et al. Effects of pre and postharvest chitosan treatments to control storage gray mold of table grappes. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 67, p. 1862-1867, 2002.

ROVERSI, Teresinha; MATTEI, Vilmar L.; SILVEIRA JÚNIOR, Paulo; FALCK, Gustavo L. Superação da dormência em sementes de acácia-negra (*A. mearnsii* Willd.). **Rev. Bras. de Agrociência**, v. 8, n. 2, p. 161-163, 2002.

SALES JR., Rui et al. **Controle Químico de Doenças Radiculares**. In: MICHEREFF, Sami J.; ANDRADE, Domingos E. G. T.; MENEZES, Maria. Ecologia e Manejo de Patógenos Radiculares em Solos Tropicais. Cap. 14. Recife: UFRPE, p. 345-365, 2005.

SANTOS, Álvaro Figueredo dos; AUER, Celso Garcia; GRIGOLETTI JÚNIOR, Albino, **Doenças do Eucalipto no Sul do Brasil: Identificação e Controle. Circular Técnica 45**, Colombo: EMBRAPA - CNPF, 20p., 2001.

_____, Álvaro Figueredo dos et al. **O complexo gomose da acácia-negra. Circular Técnica 44**, Colombo: EMBRAPA - CNPF, 8p., 2001a.

SANTOS, Flávia Elise Meneghini dos et al. Detecção de Fungos Patogênicos em Sementes de Acácia-Negra (*Acacia mearnsii* De Wild). **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 11, n. 1, p. 13-20, 2001b.

SATHIYABAMA, M.; BALASUBRAMANIAN, R. Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. **Crop Protection**, Oxford, v. 17, n. 4, p. 307-313, 1998.

SHARATHCHANDRA, R. G. et al. A Chitosan formulation Elexa™ induces downy mildew disease resistance and growth promotion in pearl millet. **Crop Protection**, Oxford, v. 23, n. 10, p. 881-888, 2004.

SCHNEIDER, Paulo Renato; TONINI, Hélio, Utilização de variáveis dummy em equações de volume para *Acacia mearnsii* De Wild. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 121-129, 2003.

SCHWAN-ESTRADA, Kátia Regina Freitas; STANGARLIN, José Renato; CRUZ, Maria Eugênia da Silva, Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. **Floresta**, Curitiba, v. 30, n. 1, p. 129-137, 2000.

SILVA, Júlio César Medeiros da; COELHO, Lísias, Resistência a fungicidas de *Botrytis cinerea* Persoon ex Fries, causador de tombamento em mudas de *Eucalyptus* sp. em viveiros florestais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 13, n. 2, p. 27-36, 2003.

SERPA, Pedro Nicolau et al. Avaliação de algumas propriedades da madeira de *Eucalyptus grandis*, *Eucalyptus saligna* e *Pinus elliottii*. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 5, p. 723-733, 2003.

SOBRINHO, C. A. et al. **Indutores abióticos**. In: CAVALCANTI, L. S. et al. Indução de Resistência em Plantas a Patógenos e Insetos. Piracicaba: FEALQ, p. 51-80, 2005.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE SILVICULTURA (SBS) **Fatos e números do Brasil Florestal 2008**, São Paulo: SBS, 91p., 2008.

STICHER, L.; MAUCH MANI, B.; METRAUX, J.P. Systemic acquired resistance. **Annual Review of Phytopathology**, Gainesville, v.35, p.235-270, 1997.

TAIZ, Lincoln; ZEIGER, Eduardo **Fisiologia Vegetal**. Tradução: SANTAREM et al., 3ª Ed., Porto Alegre: Artmed, 2004, 719p.

TANADA-PALMU, Patrícia Sayuri et al. Recobrimento de sementes de brócolos e salsa com coberturas e filmes biodegradáveis. **Bragantia**, Campinas, v. 64, n. 2, p. 291-297, 2005.

TAVARES, Giltemberg Macedo et al. Indução de resistência do mamoeiro à podridão radicular por indutores bióticos e abióticos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 11, p. 1416-1423, 2009.

TERRY, Leon A.; JOYCE, Daryl C. Elicitors of induced disease resistance in postharvest horticultural crops: a brief review. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, p. 1-13, 2004.

VALLAD, Gary E.; GOODMAN, Robert M. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. **Crop Science Society of America**, Madison, v. 44, p. 1920-1934, 2004.

VANZOLINI, Silvelena et al. Qualidade sanitária e germinação de sementes de pinhão-mansão. **Revista Brasileira de Sementes**, Campinas, v. 32, n. 4, p. 9-14, 2010.

VELAZCO, Carolina Leoni, **Indução de supressividade a *Phytophthora nicotianae* em mudas de limão cravo com lodo de esgoto.** 2002, 66f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Agronomia), ESALQ, Universidade de São Paulo Piracicaba, 2002.

VISCONTI, Alexandre; BETTIOL, Wagner; MORANDI, Marcelo Augusto Boechat, Efeito de hidrolisado de peixe sobre o crescimento micelial e controle de *Cylindrocladium spathiphylli* em espatifílio. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 298-308, 2010.

VLOT, A. Corina; KLESSIG, Daniel F.; PARK, Sang-Wook Systemic acquired resistance: the elusive signal(s). **Current Opinion in Plant Biology**, Elsevier, v. 11, n. 4, p. 436-442, 2008.

WENDLING, Ivar; FERRARI, Márcio Pinheiro; GROSSI, Fernando **Curso intensivo de viveiro e produção de mudas. Documentos 79.** Colombo: EMBRAPA - CNPF, 2002, 48p.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Effects of chitosan coating on enzymatic browning and decay during postharvest storage of litchi (*Litchi sinensis* Sonn.) fruit. **Postharvest Biology and Tecnology**, Amsterdam, v. 12, p. 195-202, 1997.

ZHANG, D.; QUANTICK, P. C. Antifungal effects of chitosan coating on fresh strawberries and raspberries during storage. **Journal of Horticultural Science Biotechnology**, Ashford, v. 73, p. 763-767, 1998.

ÍNDICE DE APÊNDICES

- APÊNDICE 01** – Análise de variância para o efeito fungistático *in vitro* de cinco concentrações de quitosana sobre *R. solani*, 48 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 68
- APÊNDICE 02** – Análise de variância para o efeito fungistático *in vitro* de cinco concentrações de quitosana sobre *R. solani*, 72 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 68
- APÊNDICE 03** – Análise de variância para o efeito fungistático *in vitro* de cinco concentrações de quitosana sobre *R. solani*, 96 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 69
- APÊNDICE 04** - Análise de variância para a porcentagem de emergência de plântulas de *E. saligna* tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011..... 69
- APÊNDICE 05** - Análise de variância para o índice de velocidade de emergência de plântulas de *E. saligna* tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 70
- APÊNDICE 06** - Análise de variância para incidência de tombamento de plântulas de *E. saligna* tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 70
- APÊNDICE 07** - Análise de variância para altura de plântulas de *E. saligna* tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 71

- APÊNDICE 08** - Análise de variância para comprimento de radícula de plântulas de *E. saligna* tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 71
- APÊNDICE 09** - Análise de variância da massa da matéria fresca (g) por plântula de *E. saligna*, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 72
- APÊNDICE 10** - Análise de variância para o teor de proteína (mg.g^{-1} de tecido) para as plântulas de *E. saligna* aos vinte um dias após a emergência, com as sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 72
- APÊNDICE 11** - Análise de variância para o teor de FAL (UAbs/min/mg prot) para as plântulas de *E. saligna* aos vinte um dias após a emergência, com as sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 73
- APÊNDICE 12** - Análise de variância para o teor de fenóis (mg.g^{-1} de tecido) para as plântulas de *E. saligna* aos vinte um dias após a emergência, com as sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 73
- APÊNDICE 13** - Análise de variância para a porcentagem de emergência de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 74
- APÊNDICE 14** - Análise de variância para o índice de velocidade de emergência de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 74

- APÊNDICE 15** - Análise de variância para a incidência de tombamento de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 75
- APÊNDICE 16** - Análise de variância para altura de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 75
- APÊNDICE 17** - Análise de variância para comprimento de radícula de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 76
- APÊNDICE 18** - Análise de variância para a massa de matéria fresca (g) de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 76
- APÊNDICE 19** - Análise de variância para o teor de proteínas (mg.g^{-1} de tecido) para as plântulas de *A. mearnsii* aos vinte um dias após a emergência, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 77
- APÊNDICE 20** - Análise de variância para o teor de FAL (UAbs/min/mg prot) para as plântulas de *A. mearnsii* aos vinte um dias após a emergência, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 77
- APÊNDICE 21** - Análise de variância para o teor de fenóis (mg.g^{-1} de tecido) para as plântulas de *A. mearnsii* aos vinte um dias após a emergência, com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011 78

APÊNDICES

APÊNDICE 01 – Análise de variância para o efeito fungistático *in vitro* de cinco concentrações de quitosana sobre *R. solani*, 48 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	34.69445	34.69445	83.1901 **
Regr. Quadrática	1	0.06604	0.06604	0.1583 ns
Regr. Cúbica	1	0.54080	0.54080	1.2967 ns
Regr. 4º Grau	1	3.74411	3.74411	8.9776 **
Tratamentos	4	39.04540	9.76135	23.4057 --
Resíduo	20	8.34100	0.41705	
TOTAL	24	47.38640		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$). CV = 13,15%.

APÊNDICE 02 – Análise de variância para o efeito fungistático *in vitro* de cinco concentrações de quitosana sobre *R. solani*, 72 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	23.46125	23.46125	174.9534 **
Regr. Quadrática	1	0.08575	0.08575	0.6394 ns
Regr. Cúbica	1	0.55125	0.55125	4.1107 ns
Regr. 4º Grau	1	7.56315	7.56315	56.3993 **
Tratamentos	4	31.66140	7.91535	59.0257 --
Resíduo	20	2.68200	0.13410	
TOTAL	24	34.34340		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$). CV = 5,43%.

APÊNDICE 03 – Análise de variância para o efeito fungistático *in vitro* de cinco concentrações de quitosana sobre *R. solani*, 96 horas após a inoculação do fungo, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	5.12000	5.12000	48.8317 **
Regr. Quadrática	1	0.98414	0.98414	9.3862 **
Regr. Cúbica	1	0.24500	0.24500	2.3367 ns
Regr. 4º Grau	1	0.42526	0.42526	4.0559 ns
Tratamentos	4	6.77440	1.69360	16.1526 --
Resíduo	20	2.09700	0.10485	
TOTAL	24	8.87140		

** significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$). CV = 4,28%.

APÊNDICE 04 - Análise de variância para a porcentagem de emergência de plântulas de *E. saligna* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	18,12292	18,12292	0,1147 ns
Regr. Quadrática	1	622,79938	622,79938	3,9429 ns
Regr. Cúbica	1	90,85058	90,85058	0,5752 ns
Regr. 4º Grau	1	118,66423	118,66423	0,7513 ns
Tratamentos	4	850,43711	212,60928	1,3460 --
Resíduo	15	2369,33184	157,95546	
TOTAL	19	3219,76895		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 36,69%.

APÊNDICE 05 - Análise de variância para o índice de velocidade de emergência de plântulas de *E. saligna* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.00225	0.00225	0.0080 ns
Regr. Quadrática	1	1.29018	1.29018	4.6023 *
Regr. Cúbica	1	0.11025	0.11025	0.3933 ns
Regr. 4º Grau	1	0.47232	0.47232	1.6849 ns
Tratamentos	4	1.87500	0.46875	1.6721 --
Resíduo	15	4.20500	0.28033	
TOTAL	19	6.08000		

* significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 52,95%.

APÊNDICE 06 - Análise de variância para incidência de tombamento de pós-emergência de plântulas de *E. saligna* com as sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	93.67943	93.67943	0.2615 ns
Regr. Quadrática	1	23.86009	23.86009	0.0666 ns
Regr. Cúbica	1	84.05543	84.05543	0.2346 ns
Regr. 4º Grau	1	383.68417	383.68417	1.0710 ns
Tratamentos	4	585.27911	146.31978	0.4084 --
Resíduo	15	5373.86912	358.25794	
TOTAL	19	5959.14824		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 49,13%.

APÊNDICE 07 - Análise de variância para altura de plântulas de *E. saligna* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.04356	0.04356	0.3720 ns
Regr. Quadrática	1	0.04803	0.04803	0.4102 ns
Regr. Cúbica	1	0.00529	0.00529	0.0452 ns
Regr. 4º Grau	1	0.03432	0.03432	0.2931 ns
Tratamentos	4	0.13120	0.03280	0.2801 --
Resíduo	15	1.75640	0.11709	
TOTAL	19	1.88760		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 22,21%.

APÊNDICE 08 - Análise de variância para comprimento da radícula de plântulas de *E. saligna* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.26082	0.26082	2.6601 ns
Regr. Quadrática	1	0.09202	0.09202	0.9385 ns
Regr. Cúbica	1	0.49729	0.49729	5.0718 *
Regr. 4º Grau	1	0.00720	0.00720	0.0734 ns
Tratamentos	4	0.85733	0.21433	2.1860 --
Resíduo	15	1.47075	0.09805	
TOTAL	19	2.32808		

*significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 17,24%.

APÊNDICE 09 - Análise de variância da massa da matéria fresca (g) das plântulas de *E. saligna*, oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos vinte um dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.00027	0.00027	1.9463 ns
Regr. Quadrática	1	0.00030	0.00030	2.1094 ns
Regr. Cúbica	1	0.00006	0.00006	0.4469 ns
Regr. 4º Grau	1	0.00000	0.00000	0.0000 ns
Tratamentos	4	0.00063	0.00016	1.1257 --
Resíduo	15	0.00211	0.00014	
TOTAL	19	0.00274		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 41,24%.

APÊNDICE 10 - Análise de variância para o teor de proteínas (mg.g^{-1} de tecido) de plântulas de *E. saligna* aos vinte um dias após a emergência, oriundas de sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.01497	0.01497	0.6406 ns
Regr. Quadrática	1	0.11374	0.11374	4.8690 ns
Regr. Cúbica	1	0.06508	0.06508	2.7859 ns
Tratamentos	3	0.19379	0.06460	2.7652 --
Resíduo	8	0.18689	0.02336	
TOTAL	11	0.38067		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 30,73%.

APÊNDICE 11 - Análise de variância para o teor de FAL (UAbs/min/mg prot) de plântulas de *E. saligna* aos vinte um dias após a emergência, oriundas de sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.02726	0.02726	131.5559 **
Regr. Quadrática	1	0.00386	0.00386	18.6398 **
Regr. Cúbica	1	0.00069	0.00069	3.3346 ns
Tratamentos	3	0.03182	0.01061	51.1768 --
Resíduo	8	0.00166	0.00021	
TOTAL	11	0.03347		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 18,82%.

APÊNDICE 12 - Análise de variância para o teor de fenóis totais (mg.g^{-1} de tecido) de plântulas de *E. saligna* aos vinte um dias após a emergência, oriundas de sementes tratadas com quatro concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.07044	0.07044	0.4377 ns
Regr. Quadrática	1	0.00353	0.00353	0.0220 ns
Regr. Cúbica	1	0.16732	0.16732	1.0396 ns
Tratamentos	3	0.24130	0.08043	0.4998 --
Resíduo	8	1.28754	0.16094	
TOTAL	11	1.52884		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 17,20%.

APÊNDICE 13 - Análise de variância para a porcentagem de emergência de plântulas de *A. mearnssii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	57,52227	57,52227	0,6661 ns
Regr. Quadrática	1	189,17784	189,17784	2,1907 ns
Regr. Cúbica	1	4,28311	4,28311	0,0496 ns
Regr. 4º Grau	1	82,95300	82,95300	0,9606 ns
Tratamentos	4	333,93622	83,48405	0,9668 --
Resíduo	15	1295,30749	86,35383	
TOTAL	19	1629,24370		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 36,69%.

APÊNDICE 14 - Análise de variância do índice de velocidade de emergência de plântulas de *Acacia mearnssii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0,00400	0,00400	0,0046 ns
Regr. Quadrática	1	1,51143	1,51143	1,7346 ns
Regr. Cúbica	1	0,04225	0,04225	0,0485 ns
Regr. 4º Grau	1	1,41432	1,41432	1,6232 ns
Tratamentos	4	2,97200	0,74300	0,8527 --
Resíduo	15	13,0700	0,87133	
TOTAL	19	16,04200		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 38,51%.

APÊNDICE 15 - Análise de variância da incidência de tombamento de plântulas de *Acacia mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	62.50000	62.50000	1.1177 ns
Regr. Quadrática	1	319.68643	319.68643	5.7171 *
Regr. Cúbica	1	55.22500	55.22500	0.9876 ns
Regr. 4º Grau	1	1.05657	1.05657	0.0189 ns
Tratamentos	4	438.46800	109.61700	1.9603 --
Resíduo	15	838.75750	55.91717	
TOTAL	19	1277.22550		

*significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 34,80%.

APÊNDICE 16 - Análise de variância da altura de plântulas de *Acacia mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.00900	0.00900	0.2422 ns
Regr. Quadrática	1	0.44643	0.44643	12.0115 **
Regr. Cúbica	1	0.04225	0.04225	1.1368 ns
Regr. 4º Grau	1	0.03432	0.03432	0.9234 ns
Tratamentos	4	0.53200	0.13300	3.5785 --
Resíduo	15	0.55750	0.03717	
TOTAL	19	1.08950		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 9,62%.

APÊNDICE 17 - Análise de variância do comprimento da radícula de plântulas de *A. mearnsii* oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	11.02500	11.02500	2.7286 ns
Regr. Quadrática	1	24.44643	24.44643	6.0503 *
Regr. Cúbica	1	0.30625	0.30625	0.0758 ns
Regr. 4º Grau	1	0.16032	0.16032	0.0397 ns
Tratamentos	4	35.93800	8.98450	2.2236 --
Resíduo	15	60.60750	4.04050	
TOTAL	19	96.54550		

*significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 18,90%.

APÊNDICE 18 - Análise de variância da massa de matéria fresca (g) de plântulas de *A. mearnsii*, oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, aos quinze dias após a emergência, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.00022	0.00022	0.5777 ns
Regr. Quadrática	1	0.00070	0.00070	1.8121 ns
Regr. Cúbica	1	0.00034	0.00034	0.8844 ns
Regr. 4º Grau	1	0.00025	0.00025	0.6514 ns
Tratamentos	4	0.00152	0.00038	0.9814 --
Resíduo	15	0.00579	0.00039	
TOTAL	19	0.00731		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 35,83%.

APÊNDICE 19 - Análise de variância do teor de proteínas (mg.g^{-1} de tecido) de plântulas de *A. mearnsii* aos vinte um dias após a emergência, oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.91852	0.91852	16.9286 **
Regr. Quadrática	1	0.22821	0.22821	4.2059 ns
Regr. Cúbica	1	0.00178	0.00178	0.0328 ns
Regr. Quarto Grau	1	0.20586	0.20586	3.7940 ns
Tratamentos	4	1.35437	0.33859	6.2403 --
Resíduo	10	0.54259	0.05426	
TOTAL	14	1.89695		

**significativo ao nível de 1% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 41,80%.

APÊNDICE 20 - Análise de variância para o teor de FAL (UAbs/min/mg prot) de plântulas de *A. mearnsii* aos vinte um dias após a emergência, oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.00136	0.00136	9.5766 *
Regr. Quadrática	1	0.00011	0.00011	0.7536 ns
Regr. Cúbica	1	0.00019	0.00019	1.3031 ns
Regr. Quarto Grau	1	0.00008	0.00008	0.5918 ns
Tratamentos	4	0.00174	0.00044	3.0558 --
Resíduo	10	0.00142	0.00014	
TOTAL	14	0.00316		

*significativo ao nível de 5% de probabilidade; ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 35,48%.

APÊNDICE 21 - Análise de variância do teor de fenóis totais (mg.g^{-1} de tecido) de plântulas de *A. mearnsii* aos vinte um dias após a emergência, oriundas de sementes tratadas com cinco concentrações de quitosana, UTFPR, Câmpus Dois Vizinhos, PR, 2011.

F. V.	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Regr. Linear	1	0.00121	0.00121	0.0023 ns
Regr. Quadrática	1	0.48098	0.48098	0.9116 ns
Regr. Cúbica	1	0.01342	0.01342	0.0254 ns
Regr. Quarto Grau	1	0.55105	0.55105	1.0444 ns
Tratamentos	4	1.04666	0.26166	0.4959 --
Resíduo	10	5.27608	0.52761	
TOTAL	14	6.32274		

ns não significativo ao nível de 5% de probabilidade ($p \geq 0,05$); CV = 15,10%.