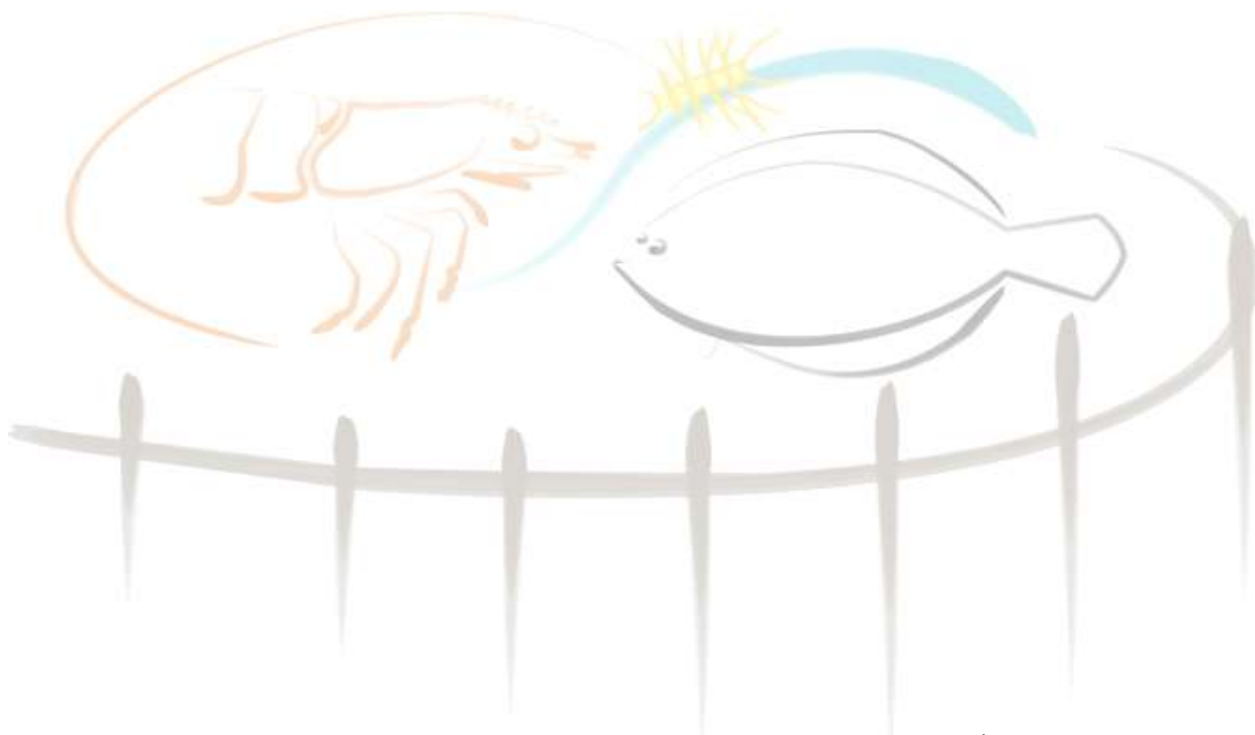




UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA



**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE PEQUENOS HERBÍVOROS E DA
INFECCÃO DE FUNGOS NA PRODUÇÃO DE MUDAS E NO
ESTABELECIMENTO DA GRAMA HALÓFITA BIOENGENHEIRA
DE MARISMAS *Spartina alterniflora***

Ricardo Franco Freitas

Rio Grande, 2014

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Instituto de Oceanografia

**Avaliação do impacto de pequenos herbívoros e da infecção de fungos
na produção de mudas e no estabelecimento da grama halófito
bioengenhreira de marismas *Spartina alterniflora***

Aluno: Ricardo Franco Freitas

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Aquicultura como parte dos
requisitos para obtenção do
título de Mestre em Aquicultura

Orientador: Prof. Dr. César Serra Bonifácio Costa

Rio Grande, RS

Abril de 2014

ÍNDICE

Lista de tabelas	i
Lista de figuras	ii
Lista de anexos	iii
Agradecimentos	v
Resumo Geral	1
Abstract	2
Introdução geral	4
Objetivos	8
Referências Bibliográficas	9
CAPÍTULO I: Efeitos do controle da infecção de afídeos e de fungos no desenvolvimento das mudas de <i>Spartina alterniflora</i> em estufa através da utilização de pesticidas	
Resumo	13
Abstract	13
Introdução	14
Material e Métodos	17
Resultados	23
Discussão	33
Conclusões	41
Referências Bibliográficas	42
CAPÍTULO II: Efeitos do controle da herbivoria pelo caranguejo <i>Neohelice granulata</i> e de fungos associados a lesões foliares no desenvolvimento de plantas de <i>Spartina alterniflora</i> transplantadas em um plano entremarés	
Resumo	50
Abstract	51
Introdução	52
Material e Métodos	54
Resultados	62

Discussão	76
Conclusões	80
Referências Bibliográficas	81
Conclusões gerais	86

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Análises de Variância das mudas de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). Produção de perfilhos (%).....25

Tabela 2: Análises de Variância dos perfilhos mais altos de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). Altura final (cm) e número de folhas vivas.....26

Tabela 3: Análises de Variância das hastes principais de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). A - Altura final (cm) e número de folhas vivas, B - Biomassa aérea seca (g).....26

Tabela 4: Análises de Variância de atributos individuais das hastes principais de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). A - Área e peso foliares, B - AFE e Impacto fitossanitário dos afídeos, C - área foliar danificada.....29

Tabela 5: Análises de Variância dos teores de clorofila *a*, *b* (A) total (*a+b*), razão *a/b* (B) e carotenóides totais (Ct) (C) de folhas das mudas de *S. alterniflora* após 90 dias sob diferentes variáveis31

Tabela 6: Análises de Variância das médias da altura final e do número de folhas vivas da haste principal (A), além do número de perfilhos e da biomassa aérea seca (B) das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a diferentes intensidade de herbivoria e aplicação de fungicida em um plano entremarés.....64

Tabela 7: Comparação das taxas de crescimento vertical (cm) e de formação foliar entre hastes pareadas com e sem lesão foliar através do Teste de Wilcoxon após 35

dias.....69

Tabela 8: Análises de Variância das médias da biomassa fúngica das folhas e da percentagem de área foliar danificada das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a diferentes intensidades de herbivoria e aplicação de fungicida em um plano entremarés.....72

Tabela 9: Análises de Variância das médias da biomassa fúngica das folhas e da percentagem de área foliar danificada da *S. alterniflora* após 35 dias de exposição a lesões simuladas de caranguejos e aplicação de fungicida em um plano entremarés.....74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Valores médios (\pm erro padrão) da produção de perfilhos das bandejas (A), altura final e número de folhas vivas dos perfilhos mais altos (C), bem como a altura final, número de folhas vivas e biomassa aérea seca (g) das hastes principais de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não aclimatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). CO = controle sem inseticida e fungicida.....27

Figura 2: Valores médios (\pm erro padrão) da área foliar (A), peso foliar (B), área foliar específica (C), impacto fitossanitário dos afídeos (D), área foliar danificada e presença de manchas fúngicas das folhas de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não aclimatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). CO = controle sem inseticida e fungicida.....30

Figura 3: Valores médios (\pm erro padrão) dos teores de clorofila *a* (A), *b* (B), carotenóides totais (C) e razão *a/b* (D) de folhas de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não aclimatizada após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). CO = controle sem inseticida (IN) e fungicida.....32

Figura 4: Valores médios (\pm erro padrão) da altura (cm; A) e número de folhas vivas (B) da haste principal, e de perfílios das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias.....66

Figura 5: Valores médios (\pm erro padrão) da biomassa aérea seca das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias.....67

Figura 6: Valores médios (\pm erro padrão) do crescimento vertical (cm) e formação de folhas de mudas recém-transplantadas e rebrotes de *S. alterniflora* após 35 dias.....70

Figura 7: Valores médios e erro padrão (\pm) da biomassa fúngica das folhas (A) e da percentagem de área foliar danificada (B) das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias.....73

Figura 8: Valores médios e erro padrão (\pm) da biomassa fúngica das folhas ($\mu\text{g erg g}^{-1}$; peso fresco) (A) e da percentagem de área foliar danificada (B) das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias.....75

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1: Desenho amostral do cultivo de *Spartina alterniflora* em bandejas sob diferentes tratamentos realizados em uma estufa.....87

Anexo 2: Folhas de *Spartina alterniflora* digitalizadas que foram coletadas em uma estufa não climatizada.....88

Anexo 3: Fotografia de uma folha de *Spartina alterniflora* lesionada naturalmente por um caranguejo *Neohelice granulata* em um plano de lama entremarés.....89

Anexo 4: Desenho amostral das gaiolas de exclusão e vazadas com mudas transplantadas de <i>Spartina alterniflora</i> durante o desenvolvimento do Experimento 1 em um plano entremarés na Ilha da Pólvora.....	90
Anexo 5: Gaiolas de exclusão e vazadas com plantas de <i>Spartina alterniflora</i> durante o desenvolvimento do Experimento 1 em um plano entremarés.....	91
Anexo 6: Fotografias de lesões simuladas do caranguejo <i>Neohelice granulata</i> em folhas de <i>Spartina alterniflora</i>	92
Anexo 7: Desenho amostral das gaiolas de exclusão com plantas (rebrote e transplantadas) de <i>Spartina alterniflora</i> durante o desenvolvimento do Experimento 2 em um plano entremarés na Ilha da Pólvora.....	93

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço o apoio incondicional que meus pais me deram ao longo desse período de mestrado. Ao restante de toda a minha família, com quem tenho muito carinho e respeito. A Jú, que vem fazendo parte da minha vida há mais de 1 ano e sempre esteve presente em todas situações (boas e ruins) comigo.

Ao César Costa, por ter me auxiliado em tudo o que eu precisava (e.g.: análises estatísticas e na parte escrita da dissertação), além de ter me dado à oportunidade de conhecer excelentes instituições de pesquisa em outro país. A todo o pessoal (Adriana, Marianna, Zóio, Priscilla, Karine, Alexandre, Daiane, Luís, Walkíria, Joca, Isabel, Margareth, Thaísa, Kennia, Mariana - técnica, Bia, Uli...) que esteve presente comigo no laboratório nesses últimos 2 anos, em que tivemos uma ótima convivência. Aos colegas do laboratório de bentos, pelas brincadeiras e boas risadas.

Aos colegas da EMA (Joaquín, Juan, Gabi, Júlio, João, Okamoto, Ricardo, Mamute, Matora...), pela parceria no futebol e ajudas essenciais ao longo da minha trajetória. A todo o grupo de trabalho do Brian Silliman, em que foram bastante atenciosos comigo durante o período que estive nos EUA. A professora Eliana Furlong e todo pessoal do laboratório de Micotoxinas, por ter me ajudado a realizar minhas análises de ergosterol.

Aos professores Geraldo Fóes e Sérgio Netto, por terem aceitado fazer parte da minha banca examinadora. Ao PPG Aquicultura, a FURG e CAPES pelo auxílio financeiro. A todos os meus amigos do Cassino (Keith, Thiago, Jajá, Dani, Je, Milton, Deusu, Tiago, Lost, Cauê, Pedro, Fernando, Diogo, Paquito, Camila, Luti, Bahia, Rob, Godô, Karl, Dani,...), pela companhia e boas conversas que tivemos.

E por fim, agradeço a todas as outras pessoas que me ajudaram de uma forma direta ou indireta durante essa fase da minha vida que está para ser encerrada.

RESUMO GERAL

A aquicultura envolve o cultivo de organismos aquáticos incluindo peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas. Estes cultivos têm como principais objetivos a produção de alimentos e outros bioprodutos para o homem. Por outro lado, os cultivos de plantas aquáticas também podem ter por finalidade o tratamento de efluentes da aquicultura, a fitorremediação de solos contaminados ou a criação/restauração de ambientes aquáticos vegetados. As plantas de marismas, como a *Spartina alterniflora*, estão entre as plantas superiores mais cultivadas pelo homem, visando a contenção de processos erosivos naturais relacionados com a elevação relativa do nível do mar. A produção de mudas em estufas agrícolas e o estabelecimento de plântulas no ambiente entremarés estão entre as etapas mais críticas para o sucesso de projetos de criação/ restauração de marismas. Em adição, o cultivo dessas plantas, assim como para qualquer outro tipo de organismo aquático, necessita de cuidados para uma maior produtividade, evitando assim pragas (herbívoros e fungos) e doenças nas plantas. Por isso, o conhecimento de mecanismos ecológicos é essencial para o sucesso nesses tipos de projetos. Dessa forma, na tentativa de avaliar o impacto de pequenos herbívoros e da subsequente infecção de fungos sobre mudas provocadas por machucaduras desses herbívoros, esta Dissertação de Mestrado descreve o desenvolvimento de 2 estudos. No primeiro estudo, apresentado no Capítulo 1, foram avaliados os efeitos da herbivoria de afídeos *Hysteroneura setariae* no desenvolvimento das mudas de *S. alterniflora* e na infecção de suas folhas por fungos. Para o controle dessas pragas, também foi determinada a eficiência da aplicação separada e conjunta do inseticida Malathion 500 CE e do fungicida Daconil BR sobre o cultivo dessas mudas em uma estufa não climatizada. Os resultados obtidos comprovaram uma grande eficiência do inseticida Malathion em proteger mudas de *S. alterniflora* contra o ataque de afídeos e fungos, além de melhorar os parâmetros biométricos e fitossanitários da planta. Em relação ao desenvolvimento da planta, é importante destacar que os valores médios de perfilhamento das mudas tratadas com inseticida foram cerca de 155% maiores do que das não tratadas com esse inseticida. O uso do fungicida Daconil não foi efetivo em diminuir os danos causados pelos afídeos e nem a infecção de fungos, facilitada durante a alimentação e

secreção de substâncias açucaradas (melada, “honeydew”) por esses insetos. Tanto que a frequência da ocorrência de manchas fúngicas nas folhas pulverizadas com esse fungicida teve valores médios em torno de 90%. Adicionalmente, esse fungicida não demonstrou ocasionar efeitos agudos no crescimento/desenvolvimento das mudas de *S. alterniflora*. O segundo estudo, descrito no Capítulo 2, foi desenvolvido na zona entremarés de uma marisma recém-estabelecida. Neste, foi examinado os impactos dos caranguejos *Neohelice granulata* e das infecções de fungos facilitadas por esses herbívoros sobre a *S. alterniflora* a partir de 2 experimentos fatoriais com a utilização de gaiolas de exclusão de caranguejos e pulverização do fungicida Daconil BR. Através dos resultados encontrados, foi possível verificar um grande impacto dos caranguejos sobre o desenvolvimento das mudas. Enquanto 100% das mudas de *S. alterniflora* protegidas com gaiolas de exclusão sobreviveram, nas gaiolas vazadas a sobrevivência das mudas reduziu para 65%. As folhas lesionadas com fungicida e aquelas sem lesões e uso desse pesticida tiveram valores médios de biomassas fúngicas até 70% mais baixos do que as das folhas lesionadas. Por fim, o fungicida e os fungos não afetaram no desenvolvimento e sobrevivência das mudas de *S. alterniflora* ao longo dos 2 experimentos realizados.

ABSTRACT

Aquaculture is understood to mean the farming of aquatic organisms including fish, molluscs, crustaceans and aquatic plants. The main objectives of these crops are the production of food and other bioproducts for mankind. Moreover, the cultivation of aquatic plants can also be conducted for the treatment of effluents from aquaculture, phytoremediation of contaminated soils or the creation/restoration of vegetated aquatic environments. Marsh plants such as the grass *Spartina alterniflora*, are among the most cultivated higher plants aiming to control natural erosive processes related to the relative sea level rising. The production of propagules in greenhouses and propagule establishment in the intertidal habitat are among the most critical steps to successful projects of saltmarshes creation/restoration. In addition, the cultivation of these plants, as well as any other aquatic organism, needs care for higher productivity, thus avoiding pests (herbivores

and fungi) and plant diseases. Therefore, the knowledge of ecological mechanisms is essential for success in these kinds of projects. In the attempt to assess the impact of small herbivores and subsequent fungi infection of the damaged leaves, this dissertation describes the development of two studies. In the first study, presented in Chapter 1, the effects of herbivory by the aphid *Hysteroneura setariae* in the development of *S. alterniflora* vegetative propagules and in the infection of their leaves by fungi were evaluated. The efficiency of separated and combined application of the insecticide Malathion 500 EC and the fungicide Daconil BR to control these pests was tested on plants growing in an unheated greenhouse. The obtained results proved a great effectiveness of the insecticide Malathion to protect *S. alterniflora* propagules from the attack of aphids and fungi, and also its utilization improved phytosanitary and biometric parameters of the plants. Regarding the development of the plant, the average value of tillering of the propagules treated with insecticide were about 155% higher than non-treated propagules. The use of the fungicide Daconil was not effective neither reducing the damage caused by aphids nor to avoid fungal infection, which seems to be facilitated by the secretion of sweet substances (honeydew) by aphids during feeding. This is so true that a frequency of occurrence of fungal spots around 90% on leaves sprayed with a fungicide but not with insecticide was observed. Additionally, this fungicide had no acute effects on the growth/development of *S. alterniflora* propagules. The second study, described in Chapter 2, was developed in the intertidal zone of a newly established marsh. The impacts of *Neohelice granulata* crabs herbivory and fungal infection facilitated by crabs' grazing scars on *S. alterniflora* was evaluated by 2 factorial experiments, using cages to exclude crabs and spraying of the fungicide Daconil BR. The experimental results pointed out a large impact of crabs on the development of vegetative propagules of *S. alterniflora* transplanted in the intertidal. While 100% of *S. alterniflora* propagules protected from crabs' grazing by exclusion cages survived, in open cages propagules survival decreased to 65 %. The wounded leaves with fungicide and intact leaves without fungicide had mean values of fungal biomass up to 70% lower than wounded leaves not protected by fungicide. Finally, fungicide application and thus fungi infection did not significantly affect the development and survival of *S. alterniflora* propagules during the 2 field experiments.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Plantas aquáticas de marismas e seu cultivo para qualidade de vida das regiões costeiras

A aquicultura envolve o cultivo de organismos aquáticos incluindo peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas. Estes cultivos têm por principal finalidade a produção de alimentos e outros bioprodutos para o homem. Entretanto, os cultivos de plantas aquáticas podem também ter por finalidade a implementação de processos de depuração de efluentes da aquicultura (*e.g.*, biofiltros/bioreatores), fitorremediação de solos contaminados ou a criação/restauração de ambientes aquáticos vegetados (Whisenant, 2005; Costa, 2011). Adicionalmente, como acontece para outros organismos, o cultivo sempre implica em alguma forma de intervenção (“fitotecnia”) no processo de plantio para aumentar a produção ou o sucesso/eficiência da função realizada pelas plantas, tais como fertilização, formas de irrigação, controle de pragas (doenças, herbívoros e predadores de sementes), etc.

Entre as plantas aquáticas de ambientes salinizados, as plantas de marismas estão entre as plantas superiores mais cultivadas e plantadas pelo homem, particularmente com a finalidade do estabelecimento de barreiras naturais contra a erosão costeira e recuperação de áreas degradadas (Adam, 1993; Chung, 2006; Costa et al., 2009). O desenvolvimento da vegetação de marisma permite conservar o solo, nutrientes, processos hidrológicos funcionais de ciclagem de nutrientes e de captura de carbono da atmosfera a partir da energia solar (Adam, 1993; Costa et al., 1997). Conseqüentemente, o plantio dessas plantas aquáticas pode levar a criação de uma paisagem capaz de auto-reparação, que fornecem bens e serviços necessários para uma sustentabilidade ecológica e socioeconômica da zona costeira.

Marismas são formadas a partir da colonização de planos entremarés arenosos e lamosos por plantas herbáceas halófitas que podemos chamar de “bioengenheiras” (Chung, 2006; Marangoni & Costa, 2012). Estas espécies pioneiras fixam carbono da atmosfera a partir da fotossíntese, formam raízes, caules e folhas que favorecem a deposição e fixação

do sedimento, funcionando como obstáculo contra a erosão costeira (Pennings & Bertness, 2001; Halpern et al., 2007). As marismas vão gradualmente soerguendo em relação às regiões aquáticas não vegetadas, formando ambientes favoráveis à colonização de outras espécies vegetais e animais, menos tolerantes ao alagamento e a salinidade (Adam, 1993; Halpern et al. 2007). As principais espécies bioengenheiras de marismas são gramas do gênero *Spartina*, e transplantes destas plantas podem ser feitos em pequena média ou larga escala, utilizando mudas originadas em viveiros de sementes ou pela propagação vegetativa (Chung, 2006; Halpern et al., 2007; Mendonça & Costa, 2008). Globalmente, tem ocorrido perdas cumulativas de áreas de marismas, tanto devido aos processos erosivos de naturais associados à elevação relativa do nível do mar como pela ocupação humana da região costeira, com aterros e/ou contaminação das águas e sedimentos (Chung, 2006; Costa et al., 2009). Conseqüentemente, a restauração de marismas impactadas e a criação de novas áreas de marismas a partir de plantas bioengenheiras constituem ações prioritárias de manejo para manutenção destas unidades ambientais.

2. Limitações da produção de mudas e do estabelecimento de plantas na zona entremarés devido ao pastoreio por pequenos herbívoros e infecção foliar por fungos

No Brasil, a propagação e plantios experimentais das espécies nativas de *Spartina* começaram a ser realizados na década de 1990 (Costa, 2011). Duas das etapas mais críticas para o sucesso de um projeto de restauração ou criação de marisma são a produção de mudas e o estabelecimento de plântulas no ambiente entremarés. Diversos estudos demonstraram uma grande sensibilidade das plantas jovens a condições abióticas estressantes, tais como altas frequências de alagamento, baixos potenciais de oxi-redução e altas salinidades (Bertness, 1991; Castillo et al., 2000; Chung, 2006; Deng et al., 2008; Marangoni & Costa, 2012). Muito menos é conhecido sobre os efeitos das interações bióticas sobre as plantas de marismas, entretanto, tanto em viveiros como no ambiente natural, a sobrevivência e o crescimento das mudas podem ser gravemente afetados pela ação de invertebrados herbívoros e de fungos endoparasitas.

Os principais insetos que se alimentam de plantas de marismas são gafanhotos

(famílias Tettigoniidae e Acrididae), pequenas cigarras (Hemiptera, Cicadellidae) e afídeos (Hemiptera, Aphididae) (Salgado & Pennings, 2005; Ho & Pennings, 2008). Estes insetos herbívoros compõem importantes elos tróficos das marismas com cadeias alimentares terrestres. Entretanto, em viveiros de produção de mudas de plantas de marismas, com altas densidades monoespecíficas de plantas para o aproveitamento do espaço e ausência de predadores naturais, populações de insetos mastigadores e sugadores apresentam rápido crescimento e conseqüente grande impacto sobre as plantas. O aumento da abundância desses insetos em viveiros pode acarretar redução na produção de mudas, diretamente por danos na área foliar, mas também através da inoculação das plantas com patógenos no ato da alimentação, uma vez que as machucaduras podem se tornar portas abertas para infecção por fungos e outros microrganismos (García-Guzmán & Dirzo, 2001; Zacchi & Vaughan-Martini, 2002; Hohn, 2007). O ataque por afídeos pode ser um dos principais limitantes do crescimento de plantas em estufas. Estes insetos são de difícil controle, devido a sua notável habilidade reprodutiva, envolvendo reprodução sexuada e assexuada (paternogênese) (Dixon, 1987). A infecção secundária por fungos em lesões foliares induzidas por afídeos pode ser facilitada pela excreção de uma substância açucarada (denominada “melada”; “honeydew”) pelo afídeo durante a alimentação sobre a planta (Choudhury, 1985; Dixon, 1987). Intensa infecção de afídeos sobre plantas de *S. alterniflora* e *S. densiflora* propagadas em estufa, com proliferação de manchas fúngicas endodérmicas e significativa perda de mudas, foi observada por Lobato et al. (2007) em Rio Grande (RS).

Invertebrados aquáticos herbívoros podem desempenhar um importante papel no controle da sobrevivência de plântulas recém-estabelecidas na zona entremarés (Costa, 2011; Marangoni & Costa, 2012). O pastoreio por caranguejos (Costa et al., 2003; Alberti et al., 2007) e por gastrópodos nas marismas (Silliman & Zieman, 2001; Silliman & Newell, 2003; Silliman et al., 2005) frequentemente limita o crescimento das plantas afetadas, além de reduzir sua altura e/ou sua biomassa das hastes. A abundância destes invertebrados aquáticos herbívoros é frequentemente controlada por predadores, cuja remoção por fenômenos naturais ou atividades antrópicas podem desencadear cascatas tróficas (Silliman & Bertness 2002). O pastoreio pelo caramujo *Littoraria irrorata* sobre

Spartina alterniflora, por exemplo, pode depauperar completamente grandes áreas de marismas no sul dos Estados Unidos quando presente em altas densidades (Silliman & Zieman, 2001; Silliman & Newell, 2003). No sul do Brasil o pastoreio pelo caranguejo *Neohelice granulata* pode ser responsável por 56% das mortes de plantas de *S. alterniflora* no primeiro mês após seus plantios na zona entremarés (Marangoni & Costa, 2012). Dada a ampla distribuição e grande abundância de *N. granulata* nas marismas do sudoeste Atlântico, além de sua habilidade de suprimir o crescimento das plantas de *Spartina* (Bortolus & Iribarne, 1999; Costa et al., 2003; Silliman & Bortolus, 2003; Rosa & Bemvenuti, 2004), este caranguejo pode atuar como um importante determinante do sucesso da colonização vegetal e da estruturação das comunidades de marismas a nível de escalas espaço-regional. Recentemente, Daleo et al. (2009) demonstraram que a herbivoria de *N. granulata* induz a infecção de fungos endoparasitas nas folhas de *S. alterniflora* e *S. densiflora*, não observada em folhas intactas, bem como a aplicação de fungicida pode reduzir a infecção de folhas danificadas. Neste último estudo, a prevenção da infecção de fungos pela aplicação de fungicida nas folhas feridas resultou em aumento do número de hastes e das biomassas aérea viva e total. O trabalho anterior foi realizado em uma marisma madura e não existem informações sobre o impacto da infecção de fungos, induzida pelo caranguejo, em áreas do entremarés sendo colonizadas por *Spartina* (marismas em formação). Esta informação é vital para o sucesso de projetos de restauração de marismas através do plantio de *Spartina* nesta região do Atlântico.

O pastoreio por afídeos e caranguejos sobre plantas do gênero *Spartina* pode facilitar a infecção por fungos parasitas, durante a produção de mudas em viveiros e no estabelecimento em novas áreas de marismas. Estes processos podem limitar o sucesso de projetos de restauração/criação de marismas envolvendo o plantio destas gramas bioengenheiras. Do ponto de vista ecológico, a ação dos fungos sobre a matéria vegetal produzida pelas plantas de marismas é importante para a reciclagem dos nutrientes, bem como a biomassa fúngica é um componente substancial de teias detritívoras estuarinas (Newell, 1992; Newell, 2001a; Silliman & Newell, 2003). A necessidade e a eficiência da adoção do controle de fungos com pesticidas devem ser cuidadosamente avaliadas, de

forma a não comprometer o próprio ambiente que se deseja preservar. Esta Dissertação de Mestrado avaliou os efeitos do pastoreio de afídeos, em ambiente de viveiro, e do caranguejo *N. granulata*, em uma marisma recém-estabelecida por plantio, no desenvolvimento de mudas de *S. alterniflora* e na infecção de suas folhas por fungos.

No Capítulo 1, foi avaliada a eficiência da aplicação separada e conjunta do inseticida Malathion 500 CE e fungicida Daconil BR no controle do ataque por afídeos *Hysteroneura setariae* e da infecção foliar por fungos em mudas de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada, no período de outubro de 2012 a janeiro de 2013.

O Capítulo 2, conduzido durante novembro de 2012 a abril de 2013, descreve os impactos da herbivoria pelo caranguejo *N. granulata* e da infecção de fungos em lesões simuladas desse herbívoro no desenvolvimento de plantas de *S. alterniflora* em uma zona entremarés. Este estudo foi realizado em uma marisma recém-estabelecida através de experimentos fatoriais com a utilização de gaiolas de exclusão e aplicação do fungicida Daconil BR.

OBJETIVOS

- Quantificar o impacto da infecção de afídeos e da infecção foliar por fungos sobre o desenvolvimento (produção de área foliar e de perfilhos) e qualidade (aspecto fitossanitário, danos foliares e pigmentos fotossintetizantes) de mudas de *S. alterniflora* cultivadas em estufa .
- Quantificar o impacto do pastoreio do caranguejo *N. granulata* no desenvolvimento das mudas de *S. alterniflora* (crescimento, produção de área foliar e de perfilhos) e na infecção das folhas destas por fungos, em uma área recém-estabelecida de marisma no estuário da Lagoa dos Patos (Rio Grande, RS).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adam, P., 1993. Saltmarsh ecology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Alberti, J., Escapa, M., Daleo, P., Iribarne, O., Silliman, B., Bertness, M., 2007. Large-scale herbivory patterns and grazing effects of the burrowing crabs in Southwestern Atlantic salt marshes. *Marine Ecology Progress Series* 349, 235-243.
- Bertness, M.D., 1991. Interspecific interactions among high marsh perennials in a New England salt marsh. *Ecology* 72, 125-137.
- Bortolous, A., Iribarne, O., 1999. Effects of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt marsh. *Marine Ecology Progress Series* 178, 79-88.
- Castillo, J.M., Fernández-Baco, L., Castellanos, E.M., Luque, C.J., Figueroa, M.E., Davy, A.J., 2000. Lower limits of *Spartina densiflora* and *S. maritima* in a Mediterranean salt marsh determined by different ecophysiological tolerances. *Journal of Ecology* 88, 801-812.
- Costa, C.S.B., 2011. Restoration of Coastal Salt marshes in Brazil using Native Salt Marsh Plants. In: Greipsson, S. (Ed.), *Restoration Ecology*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, pp. 333-338.
- Costa, C.S.B., Seeliger, U., Oliveira, C.P.L, Mazo, A.M.M., 1997. Distribuição, funções e valores das marismas e pradarias submersas no estuário da Lagoa dos Patos (RS, Brasil). *Atlântica* 19, 65-83.
- Costa, C.S.B., Marangoni, J.C. & Azevedo, A.M.G., 2003. Plant zonation in irregularly flooded salt marshes: relative importance of stress tolerance and biological interactions. *Journal of Ecology* 91, 951-965.
- Costa, C.S.B., Iribarne, O.O., Farina, J.M., 2009. Human impacts and threats to the conservation of South American salt marshes. In: Silliman, B.R., Grosholtz, T., Bertness, M.D. (Eds.), *Salt Marshes under Global Siege*. University of California Press, Berkeley, pp. 337-359.
- Choudhury, D., 1985. Aphid honeydew - a re-appraisal of Owen and Wiegert's hypothesis. *Oikos* 45, 287-289.

- Chung, C.H., 2006. Forty years of ecological engineering with *Spartina* plantations in China. *Ecol. Engineering* 27, 49-57.
- Daleo, P., Silliman, B.R., Alberti, J., Escapa, M., Canepuccia, A., 2009. Grazer facilitation of fungal infection and the control of plant growth in south-western Atlantic salt marshes. *Journal of Ecology* 97, 781-787.
- Deng, Z., An, S., Zhao, C., Chen, L., Zhou, C., Zhi, Y., Li, H., 2008. Sediment burial stimulates the growth and propagule production of *Spartina alterniflora* Loisel. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 818-826.
- Dixon, A.F.G., 1987. Aphid reproductive tactics. In: Population structure, genetics and taxonomy of aphids and Thysanoptera. The Hague, SPB Academic Publishing, pp. 3-18.
- García-Guzmán, G., Dirzo, R., 2001. Patterns of leaf-pathogen infection in the understory of a Mexican rain forest: incidence, spatiotemporal variation, and mechanisms of infection. *American Journal of Botany* 88, 634-635.
- Halpern, B.S., Silliman, B.R., Olden, J.D., Bruno, J.P., Bertness, M.D., 2007. Incorporating positive interactions in aquatic restoration and conservation. *Frontiers in Ecology and the Environment* 5, 153-160.
- Ho, C.K., Pennings, S.C., 2008. Consequences of omnivory for trophic interactions on a salt marsh shrub. *Ecology* 89, 1714-1722.
- Hohn, T., 2007. Plant virus transmission from the insect point of view. In: Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 104, 17905-17906.
- Lobato, R.C., Silveira, E.S., Costa, C.S.B., 2007. Mancha Foliar Fúngica em *Spartina densiflora*. In: IX Jornada Biológica, Rio Grande-RS. IX Jornada Biológica: Programas e Resumos. Ed. FURG, Rio Grande, p.52.
- Marangoni, J.C., Costa, C.S.B., 2012. Short- and long-term vegetative propagation of two *Spartina* species on a salt marsh in southern Brazil. *Estuaries & Coasts* 35, 763-773.
- Mendonça, P.T., Costa, C.S.B., 2008. Efeitos da disponibilidade de nitrogênio e fósforo no estabelecimento de *Spartina alterniflora* em um plano entremarés irregularmente alagado. *Neotropical Biology and Conservation* 3, 135-148.
- Newell, S.Y., 1992. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In:

- Carroll, G.C., Wicklow, D.T. (Eds.), The Fungal Community. Marcel-Dekker, New York, pp. 521-561.
- Newell, S.Y., 2001a. Multiyear patterns of fungal biomass dynamics and productivity within naturally decaying smooth cordgrass shoots. *Limnology and Oceanography* 46, 573-583.
- Pennings, S.C., Bertness, M.D., 2001. Salt marsh communities. In: Bertness, M.D., Gaines, S.D., Hay, M.E. Marine community ecology. Sinauer Associates, Sunderland.
- Rosa, L.C., Bemvenuti, C.E., 2004. Infaunal recruitment patterns in soft bottom habitats of the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: influence of *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae) disturbance. *Iheringia - Série Zoologia* 94, 301-305.
- Salgado, C.S., Pennings, S.C. 2005. Latitudinal variation in palatability of salt-marsh plants: are differences constitutive? *Ecology* 86, 1571-1579.
- Silliman, B.R., Zieman, J.C., 2001. Top-down control of *Spartina alterniflora* growth by periwinkle grazing in a Virginia salt marsh. *Ecology* 82, 2830-2845.
- Silliman, B.R., Bertness, M.D., 2002. A trophic cascade regulates salt marsh primary production. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 99, 10500-10505.
- Silliman, B.R., Bortolous, A., 2003. Underestimation of *Spartina* production in Western Atlantic salt marshes: marsh invertebrates eat more than just detritus. *Oikos* 143,549-555.
- Silliman, B.R., Newell, S.Y., 2003. Fungal-farming in a snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 100, 15643-15648.
- Silliman, B.R., Van de Koppel, J., Bertness, M.D., Stanton, L.E., Mendelsohn, I.A., 2005. Drought, snails, and large-scale die-off of southern U.S. salt marshes. *Science* 310, 1803-1806.
- Whisenant, S.G. 2005. Managing and directing natural succession. In: Manourian, S., Vallauri, D. & Dudley, N. (Eds.). *Forest restoration in landscapes: beyond planting trees*. Springer, New York, pp. 257-261.
- Zacchi, L., Vaughan-Martini, A.E., 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. *Annals of Microbiology* 52, 237-244.

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Programa de Pós Graduação em Aquicultura
Instituto de Oceanografia

CAPÍTULO I

**Efeitos do controle de afídeos e da infecção de fungos no
desenvolvimento das mudas de *Spartina alterniflora* em estufa
através da utilização de pesticidas**

Ricardo Franco Freitas

**O presente capítulo está apresentado de acordo com as normas para submissão da
revista Ecological Engineering**

RESUMO

A produção de mudas da grama *Spartina alterniflora* é considerada uma das etapas críticas para o sucesso de projetos de restauração ou criação de marismas. Em estufas, as altas densidades monoespecíficas de mudas para o aproveitamento do espaço resultam em vulnerabilidade ao rápido crescimento de pragas, como afídeos *Hysteronneura setariae* e fungos. O presente trabalho visou avaliar a eficiência da aplicação separada e conjunta de Malathion 500 CE e Daconil BR no controle da herbivoria por afídeos *H. setariae* e da infecção por fungos sobre mudas de *S. alterniflora* crescendo em estufa não climatizada, através de um experimento fatorial. Os resultados demonstraram que o inseticida Malathion protegeu eficientemente a *S. alterniflora* do ataque por *H. setariae*, reduzindo a densidade média em 70% desse afídeo em relação a plantas não tratadas com Malathion. Os valores médios dos parâmetros biométricos (*e.g.*: altura das hastes, produção de perfílios e biomassa aérea seca) e fitossanitários (*e.g.*: área foliar danificada, teores de clorofila e carotenóides, presença de manchas fúngicas) dos tratamentos com inseticida também foram superiores do que os não tratados. O efeito positivo no desenvolvimento das plantas de *S. alterniflora* pulverizadas com Malathion foi devido principalmente a inibição dos danos foliares causados pelos afídeos *H. setariae*. Por exemplo, a área foliar danificada em plantas com inseticida foi cerca de 70 % menor do que os tratamentos restantes. O uso do fungicida Daconil sobre mudas de *S. alterniflora* não melhorou o desenvolvimento das mudas em relação aos tratamentos sem esse pesticida. Em adição, esse fungicida demonstrou ser ineficiente em prevenir a infecção fúngica associada ao ataque dos afídeos, pois 90% das folhas pulverizadas com esse pesticida tiveram presença de fungos. Logo, uma alta produtividade de mudas em um curto período de tempo e com menor gasto em insumos pode ser alcançado somente com uso do inseticida Malathion.

ABSTRACT

The production of *Spartina alterniflora* propagules is considered one of the most critical steps to successful projects of saltmarsh creation/restoration. In greenhouses, the high

density of monospecific propagules to active a better use of the space, results in vulnerability to the rapid growth of pests, like aphids *Hysteroneura setariae* and fungi. This study aimed to evaluate the efficiency of separated and combined application of the insecticide Malathion 500 EC and the fungicide Daconil BR to control herbivory by aphids *H. setariae* and fungal infection on *S. alterniflora* vegetative propagules growing in an unheated greenhouse, through a factorial experiment. The results showed that the insecticide Malathion efficiently protected *S. alterniflora* from attack by *H. setariae*, reducing the mean aphids density 70% in comparison to values observed on plants not treated with Malathion. The mean values of biometric parameters (*i.e.*: shoot height, tiller production and aerial dry biomass) and plant health traits (*i.e.*: damaged leaf area, chlorophyll and carotenoids contents, presence of fungal spots on leaves) of insecticide treatments were higher than those of untreated plants. The positive effect on the development of *S. alterniflora* plants sprayed with Malathion was primarily due to an inhibition of leaf damage caused by aphids *H. setariae*. For example, the damaged leaf area of the plants with insecticide was around 70 % smaller than of the other treatments. The use of the fungicide Daconil was not effective neither reducing the damage caused by aphids on *S. alterniflora* propagules nor to avoid fungal infection. For instance, 90% on leaves sprayed with a fungicide had fungal spots. Therefore, a high productivity of propagules in a short period of time and with less expenses can be achieved by use exclusively the insecticide Malathion.

1. INTRODUÇÃO

Marismas são ambientes vegetados por plantas herbáceas na zona entremarés de costas temperadas e ocorrem associadas a manguezais em zonas subtropicais e tropicais. Marismas recobertas pela grama *Spartina alterniflora* Loisel. (Poaceae) ocorrem na costa atlântica do Canadá até a província de Chubut no sul da Argentina (Costa & Davy, 1992; Bortolus & Iribarne, 1999; Bertness & Silliman, 2008). Esses ambientes protegem a costa contra a força erosiva das ondas e correntes (Chung, 2006), formam habitats e fornecem alimentos para fauna costeira inclusive alguns recursos pesqueiros (Adam, 1993; Costa et

al. 1997, 2009), bem como interceptam, estocam e/ou degradam vários elementos presentes nas águas da drenagem continental e de esgotos lançados na costa (Adam, 1993; Chung, 2006; Costa et al., 2009).

Globalmente, tem ocorrido perdas cumulativas de áreas de marismas, tanto devido a ocupação humana da região costeira, com aterros e/ou contaminação das águas e sedimentos, como por processos erosivos naturais associados ou não à elevação relativa do nível do mar (Chung, 2006; Costa et al., 2009). Conseqüentemente, a restauração de marismas impactadas e a criação de novas áreas de marismas a partir de plantas bioengenheiras, tais como *S. alterniflora*, constituem ações prioritárias de manejo para manutenção destas unidades ambientais e suas funções para a qualidade de vida das regiões costeiras.

A produção de mudas de *S. alterniflora* em estufas agrícolas constitui uma das etapas mais críticas para o sucesso de projetos de restauração ou criação de marismas. A produção de mudas em estufas é caracterizada pelas suas altas densidades para o aproveitamento do espaço, resultando em vulnerabilidade ao rápido crescimento de pragas, mas principalmente insetos herbívoros e fungos (Hatcher et al., 1997; Brodsgaard & Albajes, 1999). Em marismas, os insetos são capazes de exercer forte controle na reprodução e produtividade da *S. alterniflora* (Bertness & Shumway, 1992; Daehler & Strong, 1995). Os principais insetos fitófagos que se alimentam de plantas do gênero *Spartina* são gafanhotos (famílias Tettigoniidae e Acrididae), pequenas cigarras (Ordem Hemiptera, Superfamília Cicadellidae) e afídeos (Hemiptera, Aphididae) (Salgado & Pennings, 2005; Ho & Pennings, 2008). Em viveiros com a ausência de predadores naturais, o aumento da abundância desses insetos pode acarretar em uma redução na produção de mudas, diretamente por danos na área foliar, mas também através das machucaduras que podem ser portas abertas para infecção de fungos (García-Guzmán & Dirzo, 2001).

O ataque por afídeos pode ser um dos principais limitantes do crescimento de plantas em estufas. A maioria das espécies de afídeos é pequena e imperceptível, e frequentemente se tornam abundantes. Muitos produtores estão cientes da importância dessas pragas e que são vetores de doenças e inclusive vírus (Miles, 1987b; Blackman &

Eastop, 2000). Os danos causados por afídeos, durante a alimentação e extração de seiva elaborada das plantas hospedeiras, provocam a paralisação do fluxo pelo floema (Dixon, 1986; Godfrey et al., 2000; Jansson, 2003). A relação entre planta-fungo também varia, uma mesma espécie de fungo, por exemplo, pode ser puramente saprófita, vivendo assintomaticamente com a planta, e em outro momento torna-se altamente patogênica (Hammon & Faeth, 1992; Saikkonen et al., 1998). A infecção fúngica pode ter efeitos negativos na sua eficiência fotossintética, em decorrência da liberação de substâncias tóxicas por esses microorganismos e por interferência na radiação solar pelo recobrimento da superfície foliar pelos micelos dos fungos. (Choudhury, 1985; Dixon, 1987).

Durante o desenvolvimento de um projeto de restauração de marismas no ano de 2007, na cidade de Rio Grande (RS), uma grande infestação do afídeo *Hysteroneura setariae* (Thomas, 1878) foi observada sobre plantas de *S. alterniflora* e *Spartina densiflora* propagadas em estufa, com significativa perda de mudas (C.S.B. Costa Com. Pess.). Associadas às lesões dos afídeos, foram observadas manchas fúngicas endodérmicas de coloração escura pelos fungos *Epicoccum nigrum* e *Rhodotorula* sp (Lobato et al., 2007). No caso do fungo saprófita e oportunista encontrado, *Rhodotorula* sp., sua presença é citada no trato digestório (peças bucais, etc.) de insetos sugadores e esporos podem ser passados para planta no ato da alimentação (Zacchi & Vaughan-Martini, 2002). O *H. setariae* é considerado também como praga nos cultivos de trigo, cana-de-açúcar e soja (Ingram & Summers, 1936; Chan et al., 1991), tendo sido associadas grandes abundâncias desta espécie em plantas crescendo em solos enriquecidos com nitrogênio (Jahn et al., 2005). De forma a obter uma produção mais eficiente de mudas das gramas *Spartina* em estufa, são necessárias avaliações do controle através de pesticidas de *H. setariae* e de fungos associados as suas infecções.

Uma das formas para o controle dessas pragas (insetos e fungos) em estufas é através do uso de inseticidas e fungicidas. O Malathion 500 CE é um inseticida do grupo dos Organofosforados (ingrediente ativo: malathion), com ação de contato e ingestão, apresentado sob a forma de concentrado emulsionável, sendo eficaz contra o ataque de diversos insetos (afídeos, moscas, formigas) nas plantas. Além disso, possui alto poder residual, proporcionando boa durabilidade no controle de insetos (Whitehead, 1997). Já o

Daconil BR é um fungicida de contato (atua diretamente sobre o patógeno), pertence ao grupo Isoftalonitrila e tem o chlorothalonil como ingrediente ativo. Esse pesticida é empregado na forma de pulverizações no controle de inúmeras doenças fúngicas em diversos cultivos de plantas (Ihara, 2014).

O presente trabalho visou avaliar a eficiência da aplicação separada e conjunta de Malathion 500 CE e Daconil BR no controle da herbivoria por afídeos *H. setariae* e da infecção por fungos sobre mudas de *S. alterniflora* crescendo em estufa não climatizada, através de um experimento fatorial. Adicionalmente, o impacto dos afídeos e da infecção de fungos no desenvolvimento de mudas de *S. alterniflora* (e.g., altura de hastes, produção foliar, teor foliar de clorofila e perfilhamento) foi quantificado, bem como foi testada a hipótese de facilitação da infecção de fungos em folhas de *S. alterniflora* por lesões foliares ocasionadas pelos afídeos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento experimental e aplicação dos tratamentos

O experimento foi realizado entre outubro de 2012 e janeiro de 2013 em uma estufa agrícola não climatizada localizada no Museu Oceanográfico “Prof. Eliézer de Carvalho Rios” da FURG (Rio Grande, RS). Plantas de *S. alterniflora* (com limbos foliares sadios/íntegros) coletadas na marisma da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS, 32°02'06"S e 52°05'55"W), já crescendo na estufa, foram separadas em mudas contendo uma haste (colmo) com raízes e fragmentos de rizomas. Essas mudas foram acomodadas em bandejas plásticas (30 cm x 50 cm) com sedimento fino da praia e composto orgânico (3:1), formando um leito de aproximadamente 5 cm de espessura no fundo das bandejas para enraizamento e formação de perfilhos (*i.e.*, novas hastes resultantes do brotamento de botões germinativos) (Mendonça & Costa, 2008; Costa, 2011). A análise do sedimento fino de praia indicou a seguinte composição: pH= 7,2; N= 0,3 mg kg⁻¹; P= 0,5 mg kg⁻¹; e K= 19,0 mg kg⁻¹. O composto orgânico tipo “terra preta” utilizado da marca Humosolo Vida, foi previamente peneirado em malha de 5 mm, e apresentou a seguinte composição: pH=

5,6; N= 7,7 g kg⁻¹; P= 3,7 g kg⁻¹; e K= 1,6 g kg⁻¹. As mudas foram irrigadas a cada 2-3 dias com água doce de torneira e a cada 15 dias eram borrifadas com água do mar, que fornece suplementação de sódio necessária para estas plantas halófitas C4 (Cunha et al., 2005) e limita o crescimento de briófitas no sedimento.

Em outubro de 2012, foram estabelecidas 12 bandejas com 20 mudas de *S. alterniflora* por bandeja, totalizando 240 mudas. As mudas mortas (n = 3) na primeira semana de cultivo foram repostas. Durante esse estabelecimento das mudas, todas as bandejas receberam uma suplementação nutricional através da adição de 25g N m⁻² e 28g P m⁻² (Leal et al., 2011); os nutrientes utilizados foram do tipo granulado industrial, marca “Ourofertil”, P como superfosfato (P₂O₅) e N como sulfato de amônia [(NH₄)₂SO₄]. Nessa etapa inicial, uma baixa frequência de indivíduos alados e ápteros do afídeo *Hysteroneura setariae* já era observada entre as hastes de *S. alterniflora* na estufa. Essa espécie é frequente nas estufas com mudas de *S. alterniflora* em Rio Grande (RS) e a identidade taxonômica foi confirmada pelo Dr. Carlos Roberto Sousa e Silva (Depto. de Ecologia e Biologia Evolutiva, Universidade Federal de São Carlos - UFSCar). Após a primeira semana de cultivo, cada haste principal das mudas foi marcada na base do colmo pela amarração de um fio elétrico fino encapado, e as bandejas foram separadas aleatoriamente em 4 grupos de 3 bandejas, sendo cada grupo submetido aos respectivos tratamentos: (1) “IN” aplicação de inseticida Malathion 500 CE (5 mL L⁻¹; doravante denominado Malathion) (2) “FU” aplicação de fungicida genérico Daconil BR (1,5 g L⁻¹; doravante denominado Daconil); (3) “IN+FU” aplicação conjunta do fungicida e do inseticida; e (4) “CO” bandejas controle sem aplicação de fungicida ou inseticida (Anexo 1).

As pulverizações de inseticida e/ou fungicida foram repetidas diretamente sobre as bandejas a cada 3 semanas. A concentração e a frequência de aplicação do Malathion (total de 20 mL L⁻¹ em 3 meses) seguiram recomendações de Martin & Worthing (1976) e do fabricante do Malathion 500 CE (Insetimax, 2014). A aplicação do Daconil (total de 6 g L⁻¹ em 3 meses) esteve dentro dos valores utilizado por Silliman & Newell (2003) para *S. alterniflora* e dos recomendados pelo fabricante do Daconil BR, quando utilizado no controle de infecção fúngica em gramíneas (Ihara, 2014). Exceto pelas bandejas tratadas com pesticidas, foi permitido à população de afídeos dentro da estufa crescer sem nenhuma

forma de restrição. Durante os 90 dias de duração do experimento, a cada 2 semanas a posição das bandejas na estufa foi trocada, para minimizar os efeitos de variações espaciais na penetração solar e temperatura. Ao longo do experimento, foram medidas diariamente as temperaturas mínimas, médias e máximas presentes na estufa. Além disso, também foram analisadas as salinidades da água intersticial do solo das bandejas nos últimos 2 meses do cultivo (1 vez por mês), estimada através de um condutivímetro digital (Hanna, Modelo HI 9835). Os valores de salinidade foram expressos em gNaCl L^{-1} , considerando a relação de conversão $52 \text{ dS m}^{-1} = 35 \text{ gNaCl L}^{-1}$.

2.2. Avaliações biométricas das plantas e da densidade de afídeos

No dia da primeira aplicação de inseticida e fungicida, foram quantificadas a altura (cm) e o número de folhas vivas da haste principal de cada muda. Após noventa dias, foi avaliado o desempenho global por recipiente de cultivo através da quantificação da produção de perfilhos por *S. alterniflora* (expressa como percentagem da densidade inicial). A altura (cm) e o número de folhas vivas de todas as plantas em cada bandeja foram medidas. Valores destes parâmetros das hastes principais (mudas originais) e dos vinte perfilhos mais altos de cada bandeja foram analisados separadamente. Esses maiores perfilhos selecionados representam o melhor desenvolvimento de novas mudas brotadas durante os 90 dias de experimento, em cada tratamento experimental. O procedimento de avaliar o melhor desempenho foi adotado para prevenir a distorção da inserção da medição de brotos em expansão na avaliação do “máximo” potencial de crescimento desta planta clonal nos tratamentos experimentais. Devido à arquitetura clonal de *Spartina*, após várias semanas de desenvolvimento e perfilhamento cada bandeja passa a possuir brotos recentes, com poucos centímetros, hastes jovens e hastes maduras (“parentais”). Desta forma uma melhor avaliação do potencial de crescimento da planta pode ser obtida considerando apenas grupos de hastes que atingiram um maior desenvolvimento (Costa & Seeliger, 1988; Costa et al., 2003; Deng et al., 2008).

Ao final do experimento, as vinte hastes principais de cada bandeja de *S. alterniflora* ($n = 60$ por tratamento) foram cortadas, próximo a superfície do sedimento, e

tiveram a maior folha de cada haste separada do colmo (n = 60 folhas por tratamento). Para cada uma destas folhas maduras foi determinado por visualização o impacto fitossanitário dos afídeos. Este atributo foi avaliado através de uma escala visual de quatro níveis adaptada de Marin (1988): 0 = limbo foliar clorofilado, aparência sadia verde homogênea; 1 = limbo foliar levemente danificado (< 1/5 da área) e/ou com pequenas áreas perfuradas, amareladas e/ou despigmentadas; 2 = limbo foliar mediamente injuriado, entre 1/5 e 2/5 da área danificada e/ou amareladas e/ou despigmentadas; 3 = limbo foliar altamente injuriado, > 2/5 da área danificada, amareladas e/ou despigmentadas.

A maior folha de cada haste principal também tiveram suas superfícies digitalizadas em um Scanner HP Scanjet 2400 a uma resolução de 300 dpi. Posteriormente, as biomassas secas de cada folha (peso foliar) e da parte remanescente do colmo das hastes principais (parte aérea com as demais folhas) foram estimadas após secagem em estufa a 60 °C por 48 horas e pesagem em balança de precisão (± 1 mg). As imagens das folhas digitalizadas foram analisadas através do software ImageJ® (Abramoff et al., 2004), para determinar valores de área foliar (cm^2), percentagem de área foliar danificada (perfurações e/ou manchas fúngicas) relativa à área do limbo foliar. A área foliar específica ($\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$) (doravante denominado AFE) foi posteriormente calculada a partir do quociente entre a área (cm^2) e a massa (g) de cada folha, tendo como objetivo de avaliar a alocação da biomassa da folha (em decorrência de fatores ambientais/bióticos) por unidade de área (Evans, 1972; Poorter & Garnier, 1999). Adicionalmente, a imagem de cada folha foi inspecionada e a ocorrência ou não de manchas fúngicas registrada, para posterior comparação da frequência de infecção fúngica entre tratamentos. Os principais fungos associados as folhas foram identificados pela Dra. Érica Silveira (IO-FURG).

Ao final do experimento, a densidade de afídeos foi estimada para todas as bandejas. Para realizar essa medição, foram colocadas duas fitas pega-moscas (área total = 240 cm^2 ; $0,024 \text{ m}^2$) no fundo de uma bandeja plástica com área de $0,15 \text{ m}^2$ (30 cm x 50 cm), e em seguida, uma bandeja com plantas foi colocada perpendicularmente às fitas pega-moscas e as hastes das plantas chacoalhadas vigorosamente por dois minutos, de forma a retirar o máximo possível dos afídeos presentes. Após este procedimento, o número de afídeos foi quantificado nas fitas pega-moscas com o auxílio de uma lupa manual (10X) e a

densidade de afídeos estimada para a bandeja através da multiplicação do valor encontrado por 6,25 (razão entre a área da bandeja de quantificação e a área das fitas pega-moscas) e expressa em indivíduos por m² de bandeja. Este procedimento foi repetido para as 12 bandejas experimentais.

2.3. Análise de pigmentos fotossintéticos

Ao final do experimento, foram coletadas aleatoriamente 6 folhas completamente expandidas de hastes de cada tratamento (n = 2 folhas por bandeja réplica). As folhas tiveram a superfície dos seus limbos lavada com água destilada, foram colocadas individualmente em sacos plásticos etiquetados e congeladas. Posteriormente, os pigmentos fotossintéticos foram extraídos de 0,1 g de peso fresco de cada folha usando 7 mL de solução de 90% de acetona no escuro, com ajuda de pistilo e cadinho de porcelana. As amostras foram centrifugadas (3000 rpm) por 20 minutos e o sobrenadante lido em um espectrofotômetro UV-Visível (FEMTO - Modelo 600S), usando três comprimentos de onda (470, 647 e 661 nm). Os teores de clorofila *a*, *b*, total (*a+b*), a razão *a/b* e os carotenóides totais (mg g⁻¹ peso fresco) foram estimados através das equações definidas por Lichtenthaler & Buschmann (2001).

2.4. Análise dos dados

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso, com três repetições hierarquizadas (“nested”) em cada nível de utilização de inseticida (IN; com e sem) e de fungicida (FU; com e sem). Os dados do experimento foram analisados através de Análises de Variância (Zar, 2010) em termos da resposta total por bandeja, do desenvolvimento individual das plantas e das características foliares, em cada nível dos tratamentos testados.

A produção de perfilhos de *S. alterniflora* por bandeja e a densidade de afídeos (indivíduos m⁻² de bandeja), ao final dos 90 dias do experimento, foram comparados entre níveis de utilização do inseticida (IN; com e sem) e presença do fungicida (FU; com e sem)

através de ANOVA bifatorial (com fator de interação IN x FU), seguida pelo teste de comparações múltiplas Tukey, a 5% de significância (Zar, 2010). Adicionalmente, a análise da produção de perfilhos foi realizada para valores percentuais, em relação à densidade de mudas plantadas por bandeja (20 mudas).

Para a análise do desenvolvimento individual das hastes no início (altura, nº de folhas vivas) e final do experimento (altura, nº de folhas vivas, biomassa aérea seca), bem como para as características de área foliar, área foliar específica, peso foliar, porcentagem de área foliar danificada e impacto fitossanitário dos afídeos, as médias foram comparadas entre níveis dos tratamentos através de ANOVAs unidirecionais (one way ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, a 5% de significância (Zar, 2010). Este procedimento analítico foi adotado porque, diferente do procedimento descrito no parágrafo anterior, os indivíduos (hastes ou folhas) eram as unidades amostrais e não as bandejas de cultivo. O desenho utilizado nessas ANOVAs foi o hierárquico (“nested”), com blocos de repetição representados pelas bandejas (BA) aninhados dentro dos níveis dos quatro tratamentos com pesticidas (PE) aplicados – BA(PE); o seja, IN, FU, IN+FU e controle sem IN/sem FU.

Em relação ao parâmetro da presença de manchas fúngicas nas folhas ao final dos 90 dias do experimento, este foi analisado como a frequência binária que ele representa, utilizando o teste do qui-quadrado (Zar, 2010). As concentrações de clorofilas (a, b, total e razão a/b) e carotenóides totais ao final dos 90 dias do experimento foram comparadas através de ANOVAs bifatorial com os fatores inseticida (IN; com e sem), fungicida (FU; com e sem) e interação IN x FU. Este procedimento foi adotado porque as folhas analisadas foram coletadas aleatoriamente nas bandejas (n = 2) por bandeja dos tratamentos. Quando significativas as ANOVAs foram seguida pelo teste de comparações múltiplas Tukey, a 5% de significância (Zar 2010).

Os resultados de todas as ANOVAs foram analisados quanto à significância estatística dos tratamentos, bem como pela porcentagem da variabilidade total no experimento de cada parâmetro contabilizado por cada tratamento. A contabilização da variabilidade foi realizada através do coeficiente eta quadrado, que foi calculado pela divisão da Soma dos Quadrados do tratamento “i” (SQ_i) pela Soma dos Quadrados total (SQT) da variável. O coeficiente eta quadrado foi expresso percentualmente como “%SQ_i”

(Zar, 2010).

Para todas variáveis quantificadas, foram realizadas os testes de Normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Homocedasticidade (Cochran C., Hartley e Bartlett), ambos a 5% de significância, como requisito para as análises estatísticas paramétricas (Zar, 2010). Quando necessário, transformações matemáticas foram empregadas aos valores das variáveis para atender estes requisitos. As variáveis número de folhas vivas da haste principal e número de perfílios mais altos foram transformadas pela função $\log_{10}(x)$. Mesmo após a utilização de transformações, o parâmetro AFE não atingiu o requisito de normalidade, sendo assim analisado pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

3. RESULTADOS

3.1. Dados de salinidade da água intersticial do solo das bandejas, temperatura da estufa e densidade de afídeos *Hysteroneura setariae*

Entre outubro de 2012 e janeiro de 2013, período de cultivo da *S. alterniflora*, a temperatura mínima noturna da estufa variou entre 8,0 °C e 25,0 °C (média = $17,7 \pm 4,0$ °C; \pm desvio padrão) e a temperatura máxima diurna variou entre 26 °C e 42 °C (média = $33,1 \pm 3,9$ °C).

A salinidade média da água intersticial do solo de todas as bandejas apresentou valores mínimos e máximos de, respectivamente, 1,4 e 3,8 g L⁻¹ (média = $2,4 \pm 1,0$ g L⁻¹). Em janeiro de 2014, as densidades dos afídeos *H. setariae* nas plantas de *S. alterniflora* que receberam a aplicação de inseticida Malathion (IN= $170,8 \pm 19,9$ ind. m⁻²; e IN+FU = $197,9 \pm 26,6$ ind. m⁻² de área de bandeja) foram significativamente menores ($F_{IN} = 81,5$; $p < 0,001$) do que nas plantas dos tratamentos CO ($587,5 \pm 20,1$ ind. m⁻²) e FU ($512,5 \pm 71,0$ ind. m⁻²). Por outro lado, não ocorreu efeito significativo de FU sobre a densidade dos afídeos ($F_{FU} = 0,4$; $p > 0,05$) e nem da interação IN x FU ($F_{IN \times FU} = 1,6$; $p > 0,05$).

3.2. Respostas biométricas e fitossanitárias de *S. alterniflora* a ação dos pesticidas

3.2.1 Tamanho e número de folhas vivas das hastes principais no início do experimento

A altura média e número de folhas vivas no início do experimento das hastes principais (20 mudas originais de cada bandeja) de *S. alterniflora* variaram, respectivamente, de $37,8 \pm 1,1$ (erro padrão) a $42,1 \pm 1,2$ cm e de $4,45 \pm 0,17$ a $4,95 \pm 0,11$ folhas entre os tratamentos. Diferenças significativas entre tratamentos foram detectadas apenas para o número de folhas vivas ($F_{PE} = 15,4$; $p < 0,05$), sendo diferentes apenas a maior média (tratamento FU) e a menor média (IN).

3.2.2. Produção de perfilhos por bandeja

Após 90 dias de cultivo, os perfilhamentos (% da densidade inicial) nos tratamentos IN ($239,8 \pm 41,5\%$) e IN+FU ($229,4 \pm 29,1\%$) foram significativamente maiores ($F_{IN} = 24,4$; $p < 0,01$) do que nas bandejas CO ($91,3 \pm 20,7\%$) e FU ($92,9 \pm 18,3\%$) (Fig. 1A). No entanto, não existiu diferença significativa na interação IN x FU (Tabela 1). A pulverização do inseticida contabilizou 75% da variabilidade (%SQ) na produção de perfilhos entre os tratamentos.

3.2.3. Desenvolvimento das mudas

Tanto as hastes principais de *S. alterniflora* (mudas originalmente plantadas) como os perfilhos que se desenvolveram durante os 90 dias do experimento apresentaram melhor desenvolvimento nos tratamentos com inseticida. A altura final média das hastes principais ($F_{PE} = 7,8$; $p < 0,001$) e dos perfilhos de *S. alterniflora* ($F_{PE} = 11,7$; $p < 0,001$) do CO foram significativamente mais baixas entre os tratamentos (Fig. 1B,D; Tabelas 2 e 3). Maiores alturas das hastes principais foram observadas no IN ($82,0 \pm 1,4$ cm), já na altura dos perfilhos, o IN+FU ($69,1 \pm 0,7$ cm) tiveram os valores mais altos. Os números de folhas vivas das hastes principais em IN ($4,8 \pm 0,1$) e IN+FU ($4,7 \pm 0,1$) foram significativamente maiores do que do FU ($4,3 \pm 0,1$ folhas por haste) (teste de Tukey; $p < 0,05$). Além disso, o número de folhas vivas das hastes de perfilhos do IN+FU ($3,6 \pm 0,1$) foi significativamente maior do que o CO ($3,2 \pm 0,1$) e FU ($3,2 \pm 0,1$), sendo que o tratamento IN apresentou valor médio intermediário ($3,4 \pm 0,1$) (Fig. 1C,E; Tabelas 2 e 3). De forma consistente com os resultados biométricos apresentados acima, as seis bandejas aplicadas com inseticida (IN e

IN+FU) tiveram valores médios de biomassas aéreas secas das hastes principais significativamente ($p < 0,05$) maiores do que as dos tratamentos CO e FU (Fig. 1F; Tabela 3).

A variabilidade entre as bandejas réplicas da altura dos perfilhos e das hastes principais, bem como da biomassa aérea das hastes principais dentro dos tratamentos foi muito significativa ($p < 0,001$) e contabilizou 11 a 59% da variabilidade total destes parâmetros no experimento (Tabelas 2 e 3).

Tabela 1: Análises de Variância da produção de perfilhos (% da densidade inicial) das mudas de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados.

Tratamento	Prod. de perfilhos			
	gl	%SQ	F	Sig
IN	1	75,2	24,4	**
FU	1	0,07	0,02	NS
IN*FU	1	0,13	0,04	NS
Resíduo	8	24,6		

** $p < 0,01$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

Tabela 2: Análises de Variância da altura final (Hf perf) (cm) e do número de folhas vivas (nfolviv perf) dos vinte perfilhos mais altos de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de pesticidas (PE; inseticida e fungicida). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados.

Tratamento	Hf perf				nfolviv perf		
	gl	% SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
PE	3	5,4	11,7	***	5,1	4,6	**
BA(PE)	8	59,2	47,6	***	8,9	2,9	**
Resíduo	228	35,4			86,0		

** p < 0,01; *** p < 0,001; NS: não significativo (p > 0,05).

Tabela 3: Análises de Variância da altura final (Hf haste) (cm), do número de folhas vivas (nfolviv haste) e da biomassa aérea seca (g) das hastes principais de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de pesticidas (PE; inseticida e fungicida). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados.

Tratamento	Hf haste				nfolviv haste			Biomassa aérea seca		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
PE	3	4,9	7,8	***	6,2	5,3	**	14,4	14,7	***
BA(PE)	8	47,3	28,2	***	5,3	1,7	NS	11,2	4,3	***
Resíduo	228	47,8			88,5			74,4		

** p < 0,01; *** p < 0,001; NS: não significativo (p > 0,05).

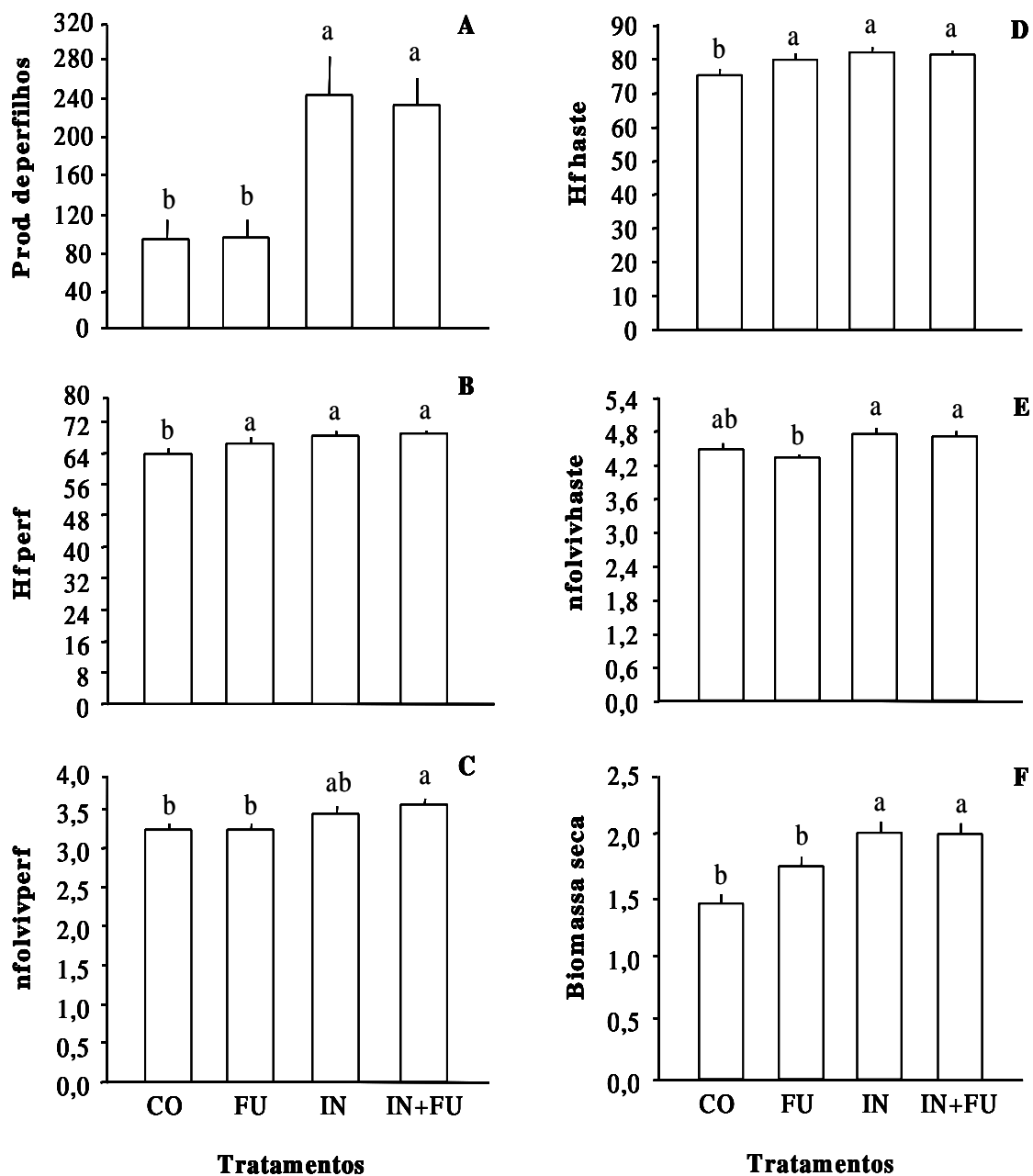


Figura 1: Valores médios (\pm erro padrão) da produção de perfilhos (%) (A), da altura final (cm) (B) e número de folhas vivas dos vinte perfilhos mais altos (C), da altura final (cm) (D), número de folhas vivas (E) e biomassa aérea seca (g) (F) das hastes principais de *S. alterniflora*. Estas plantas cresceram em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). CO = controle sem inseticida e fungicida. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

3.2.4. Desenvolvimento e parâmetros fitossanitários das folhas

As Análises de Variância das áreas, pesos foliares e AFE das mudas de *S. alterniflora* sob diferentes tratamentos com pesticidas são apresentadas na Tabela 4A,B. Tanto a área foliar média ($35,5 \pm 0,9 \text{ cm}^2$) como o peso seco foliar médio ($255,8 \pm 7,4 \text{ mg}$) das plantas nas bandejas pulverizadas somente com inseticida (IN) foram significativamente maiores ($p < 0,05$; teste de Tukey) que os tratamentos restantes (IN+FU, CO, FU) (Fig. 2A e 2B). Em adição, a AFE ($0,14 \pm 0,003 \text{ cm}^2 \text{ mg}^{-1}$) de *S. alterniflora* das bandejas IN foram significativamente superiores ($p < 0,05$) apenas aos valores de CO e FU (Fig. 2C).

As folhas pulverizadas com inseticida apresentaram percentagens de áreas foliares danificadas cerca de 3 vezes menores (IN = $12,2 \pm 0,6 \%$; IN+FU = $10,1 \pm 0,3\%$) do que as sem inseticida (CO = $34,8 \pm 1,2\%$; FU = $33,2 \pm 1,49\%$) (Fig. 2D). A visualização das áreas danificadas e/ou amareladas-despigmentadas das folhas através do impacto fitossanitário dos afídeos apresentou o mesmo comportamento significativo de diferença entre tratamentos ($F_{PE} = 129,1$; $p < 0,001$) da percentagem de áreas foliares danificadas ($F_{PE} = 264,5$; $p < 0,001$) (Tabela 4B). Entretanto, as plantas que receberam aplicações conjuntas de inseticida e fungicida (IN+FU) demonstraram um impacto fitossanitário dos afídeos significativamente menores ($p < 0,05$, teste de Tukey) do que as dos demais tratamentos (Fig. 2E). Com exceção do impacto fitossanitário, todos os demais parâmetros foliares apresentaram diferenças significativas entre as bandejas réplicas dentro dos tratamentos ($p < 0,05$); esta fonte da variação contabilizou de 12 a 17,2% da variabilidade experimental nas folhas (Tabela 4 A e 4B).

Foram identificados nas folhas de *S. alterniflora* manchas fúngicas escuras associadas às espécies *Epicoccum nigrum* e *Rhodotorula sp.*, bem como bolores brancos formados por *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.* Em relação à visualização da frequência de ocorrência de manchas fúngicas nas folhas das hastes principais, foi observada diferença ($\chi^2 = 87,4$; $p < 0,001$) entre os quatro tratamentos de pesticidas. Os valores médios do IN foram significativamente menores do que o CO ($\chi^2 = 42,8$; $p < 0,001$) e FU ($\chi^2 = 48,7$; $p < 0,001$) (Fig. 2F). As folhas pulverizadas com inseticida e fungicida (IN+FU) também apresentaram valores significativamente mais baixos do que o CO ($\chi^2 = 38,7$; $p < 0,001$) e FU ($\chi^2 = 44,4$; $p < 0,001$). Em contraste, não foram encontradas diferenças nas frequências de manchas

fúngicas entre o IN e IN+FU ($\chi^2 = 0,4$; $p > 0,05$) e CO e FU ($\chi^2 = 0,2$; $p > 0,05$).

Tabela 4: Análises de Variância da área (cm^2) e peso (mg) foliar (A), bem como área foliar específica-AFE ($\text{cm}^2 \text{mg}^{-1}$), impacto fitossanitário dos afídeos e dano foliar percentual (B) das hastes principais de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de pesticidas (PE; inseticida e fungicida). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados.

A)

Tratamento	Área foliar				Peso foliar		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
PE	3	33,0	50,0	***	15,0	16,3	***
BA(PE)	8	17,2	9,8	***	15,3	6,3	***
Resíduo	228	49,8			69,7		

*** $p < 0,001$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

B)

Tratamento	AFE				Imp. fitos. afídeos			Dano foliar		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
PE	3	26,5	34,1	***	62,8	129,1	***	68,4	264,0	***
BA(PE)	8	14,3	6,5	***	0,02	1,2	NS	12,0	17,4	***
Resíduo	228	64,2			37,2			19,6		

*** $p < 0,001$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

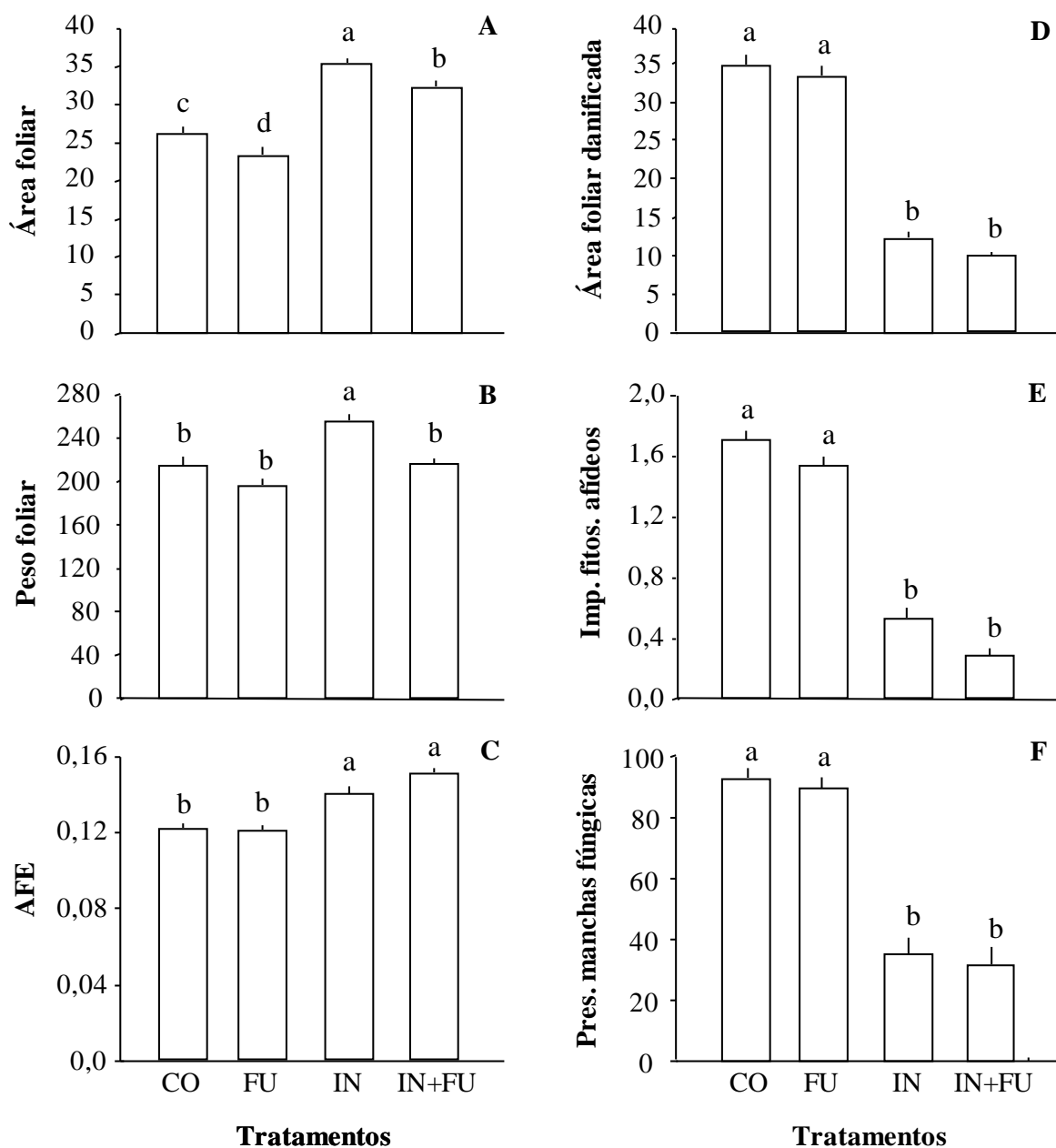


Figura 2: Valores médios (\pm erro padrão) da área foliar (cm²) (A), peso foliar (mg) (B), área foliar específica (cm² mg⁻¹) (C), impacto fitossanitário dos afídeos (D), área foliar danificada (%) e presença de manchas fúngicas (E) das folhas das hastes principais de *S. alterniflora*. Estas plantas cresceram em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). n = 3; CO = controle sem inseticida e fungicida. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

Os teores médios de clorofila (Cla, Clb, Cla+b) e carotenóides totais (Ct) das folhas de *S. alterniflora* também atestam uma melhor qualidade foliar nas plantas tratadas com inseticida (Fig 3; Tabela 5A e 5B). Estes teores foram significativamente mais altos ($p < 0,05$; testes de Tukey) em IN e IN+FU do que em FU e CO. Por exemplo, os valores médios de Cla+b dos tratamentos IN ($1,6 \pm 0,2 \text{ mg g}^{-1}$) e IN+FU ($1,5 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$) também foram cerca de três vezes maiores do que os de CO ($0,6 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$) e FU ($0,7 \pm 0,1 \text{ mg g}^{-1}$). A aplicação de inseticida contabilizou de 64 a 72% da variabilidade experimental destes pigmentos (Tabela 5A e 5B). A razão Cla/b não apresentou diferenças entre os tratamentos e nenhum dos pigmentos foliares apresentou interação significativa entre níveis dos tratamentos de inseticida e fungicida (Fig. 3D; Tabela 5B).

Tabela 5: Análises de Variância dos teores de clorofila *a*, *b* (A) total (*a+b*), razão *a/b* (B) e carotenóides totais (Ct) (C) de folhas das mudas de *S. alterniflora* crescendo em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados. $n = 6$ por tratamento.

A)

Tratamento	Cla				Clb		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
IN	1	72,3	53,5	***	64,3	37,4	***
FU	1	0,5	0,5	NS	0,01	0,0	NS
IN*FU	1	0,01	0,0	NS	1,49	0,8	NS
Resíduo	20	27,2			34,2		

*** $p < 0,001$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

B)

Tratamento	Cl _{a+b}				Cl _{a/b}			C _t		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
IN	1	71,5	50,9	***	1,5	0,5	NS	70,0	46,5	***
FU	1	0,2	0,1	NS	4,1	0,8	NS	0,12	0,1	NS
IN*FU	1	0,3	0,2	NS	4,0	0,8	NS	0,08	0,1	NS
Resíduo	20	28,0			90,4			29,8		

*** p < 0,001; NS: não significativo (p > 0,05).

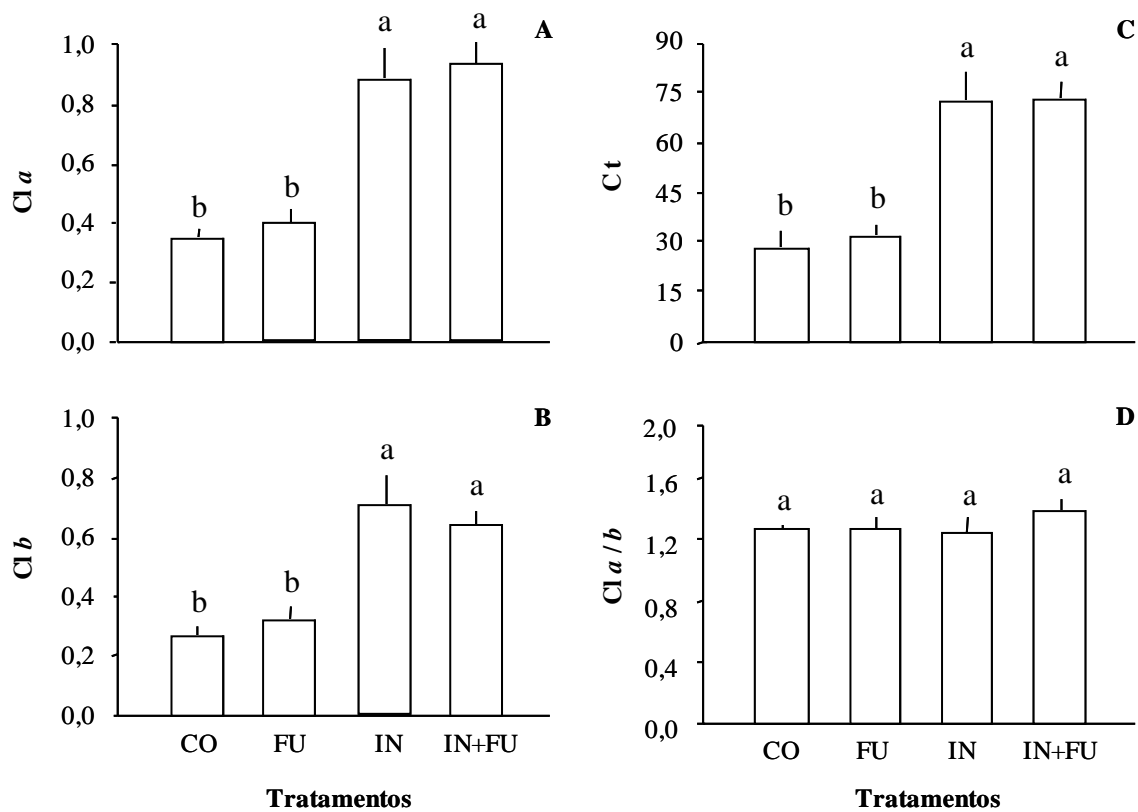


Figura 3: Valores médios (± erro padrão) dos teores de clorofila *a* (A), *b* (B), carotenoides totais (C_t) (C) e razão clorofila *a/b* (D) (mg g⁻¹ peso fresco) de folhas de *S. alterniflora*. Estas plantas cresceram em uma estufa não climatizada (Rio Grande, RS), após 90 dias de aplicação de inseticida (IN) e fungicida (FU). n = 6; CO = controle sem inseticida (IN) e fungicida. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

4. DISCUSSÃO

4.1. Abundância de afídeos e a eficiência do Malathion

O inseticida Malathion protegeu eficientemente a *S. alterniflora* da herbivoria por *H. setariae*. Ao final do experimento, no verão de 2013, a densidade média de afídeos *H. setariae* nas bandejas de produção de mudas de *S. alterniflora* que não receberam o inseticida Malathion (CO e FU) foi cerca de 550 ind. m⁻². Esta densidade foi aproximadamente 200% maior do que nas bandejas tratadas com o IN e IN+FU. O uso de Malathion em marismas de New England (E.U.A) também resultou em uma grande redução do insetos sugadores presentes em plantas de *S. alterniflora* (Bertness et al., 2008; Sala et al., 2008).

Grandes abundâncias de afídeos sobre culturas em estufas e em áreas agrícolas são comuns e frequentemente relacionadas às temperaturas favoráveis (Campbell & Mackauer, 1975), a notável habilidade reprodutiva desses insetos (Dixon, 1987, 1998), a qualidade nutricional das plantas (uso de fertilizantes) e/ou a não utilização de inseticidas (Mallot & Davy, 1978; Ho & Pennings, 2008; Marczak et al., 2011). A fertilização ou uma maior disponibilidade de nutrientes melhora a qualidade nutricional das plantas de *S. alterniflora* (Vince et al., 1981; Rossi & Stilling, 1998), que é um fator de atração de afídeos (Vince et al., 1981) e diretamente relacionado com o crescimento e a fecundidade destes insetos (Dixon, 1998; Koricheva et al., 1998). Conseqüentemente, a utilização de aplicações periódicas de Malathion sobre bandejas de crescimento de *S. alterniflora* é recomendável para o controle de afídeos em estufas.

4.2. Desenvolvimento das mudas de *Spartina alterniflora* frente a utilização de pesticidas

As plantas de *S. alterniflora* demonstraram um ótimo desenvolvimento, em termos de formação de perfilhos e do crescimento de suas hastes, nas bandejas com solo fertilizado na estufa sem climatização utilizada no experimento. Além da pequena abundância de

afídeos nas bandejas de *S. alterniflora* pulverizadas com Malathion, as plantas dessas bandejas apresentaram melhor desenvolvimento, baixos valores de danos foliares e maiores teores de pigmentos fotossintéticos.

Os valores médios de perfilhamento das plantas tratadas com inseticida foram cerca de 155% maiores do que das não tratadas, demonstrando que *S. alterniflora* tem a formação de novos propágulos marcadamente afetada pela ação do afídeo *H. setariae*. Esta magnitude de diferença na produção de perfilhos é semelhante a observada por Mallot & Davy (1978) em plantas de cevada (*Hodeum vulgare*) não infestadas e infestadas com alta densidade do afídeo *Rhopalosiphum padi*. Plantas de *S. alterniflora* crescendo em recipientes investem vigorosamente na formação de perfilhos quando expostas a alta disponibilidade de nutrientes (Deng et al., 2008) e a redução do perfilhamento em nosso experimento aponta para uma forte drenagem dos recursos fotossintetizados pelos afídeos.

Ao final do experimento, a altura, o número de folhas vivas e a biomassa aérea das hastes de *S. alterniflora* pulverizadas com inseticida também foram maiores do que das plantas não pulverizadas. Vários estudos sobre os efeitos de insetos sugadores/fitófagos demonstraram que plantas cultivadas sem a utilização do inseticida apresentaram reduções significativas no crescimento e/ou na sobrevivência (Mallott & Davy, 1978; Reed & Semtner, 1992; Deberardinis et al., 1994). A altura média das plantas de *Solidago rugosa* tratadas com inseticida Esfenvelerato (grupo dos piretróides) em uma área experimental sob a influência de insetos fitófagos foi cerca de 30% maior do que nos tratamentos controle (sem uso de pesticidas) (Carson & Root, 2000). Brown et al. (1987) também encontraram um maior número de folhas vivas em plantas de *Plantago lanceolata* tratadas com Malathion-60, em relação às plantas dessa espécie que foram pulverizadas somente com água (controle). Bertness et al. (2008) observou um aumento em até 275% da produção de biomassa aérea por *S. alterniflora* fertilizada e tratada com Malathion em marismas da costa atlântica dos E.U.A., em relação a plantas que foram fertilizadas e não pulverizadas com esse inseticida.

Apesar dos resultados positivos acima citados, o impacto do uso de outros inseticidas além do Malathion no crescimento de *S. alterniflora* em marisma tem sido variável. Por exemplo, Sala et al. (2008) observou que após uma estação de crescimento de

aplicação do inseticida Discus N/G (ingredientes ativos: Imidacloprid + Ciflutrina) ou da mistura deste com o fungicida Daconil em uma marisma, as biomassas aéreas de *S. alterniflora* foram superiores aos tratamentos controle sem inseticida e apenas com fungicida. Em contraste, no experimento realizado por Daehler & Strong (1995), não foram detectadas diferenças nas biomassas aéreas de *S. alterniflora* entre os tratamentos controle (somente água) e o inseticida Safer (orgânico; composto de sais de potássio de ácidos graxos). No caso deste último experimento, os autores apontaram que o inseticida não afetou o crescimento da *S. alterniflora*, apesar desse composto provar ser extremamente efetivo em devastar insetos fitófagos presentes na planta.

O efeito positivo no desenvolvimento das plantas de *S. alterniflora* pulverizadas com Malathion foi devido principalmente a inibição dos danos foliares causados pelos afídeos. A utilização do Malathion reduziu a área foliar de *S. alterniflora* comprometida pela alimentação dos afídeos de cerca de 35% para 10%, bem como a frequência da ocorrência de manchas fúngicas nas folhas caiu de cerca de 90% para 30%. Estes resultados também evidenciam uma forte relação entre a infecção de fungos nas folhas da planta e o sucesso dos afídeos que compartilham a mesma planta hospedeira.

Durante sua alimentação, os afídeos secretam uma substância adocicada denominada melada (“honeydew”), que constitui o excesso de seiva elaborada que atravessa o trato digestivo e não é consumido. Tanto a perfuração do tecido foliar como o recobrimento da folha com melada têm sido relacionados ao aumento de infecções fúngicas, que podem prejudicar as plantas (Fokkema et al., 1983; Choudhury, 1985; Dik & van Pelt, 1992). Várias outras evidências apontam que insetos fitófagos podem aumentar as infecções fúngicas (e até mesmos as virais e bacterianas) em uma grande variedade de ambientes, especialmente quando eles atacam folhas novas (Terhune et al., 1991; García-Guzmán & Dirzo, 2001). Daleo et al. (2009) observaram através de inspeção em estereoscópio médias de 36% e 23% de infecção fúngica, respectivamente, em folhas de *S. alterniflora* e *Spartina densiflora* com marcas de pastagem pelo caranguejo *Neohelice granulata*, coletadas em 4 marismas da Argentina. Porém, esses mesmos autores não visualizaram manchas fúngicas em folhas sadias não pastadas das mesmas marismas. Para *S. alterniflora*, foi demonstrado (Silliman & Newell, 2003) que lesões/radulações

provocadas pelo caramujo *Littoraria irrorata* promovem a infecção foliar de fungos em marismas do Atlântico Norte. Adicionalmente, em um mecanismo parecido com a deposição de melada nas folhas pelos afídeos, a deposição de *pellets* fecais do próprio gastrópodo nas lesões pode aumentar em 171% a infecção de fungos (avaliada pela biomassa fúngica) nas folhas de *S. alterniflora*, em relação às folhas lesionadas sem *pellets* (Silliman & Newell, 2003). Abaixo, a análise das respostas foliares aos pesticidas ajuda a esclarecer a ação da infecção fúngica nas plantas atacadas por afídeos.

4.3. Respostas foliares ao Malathion

Após 90 dias de cultivo, a utilização do Malathion nas mudas de *S. alterniflora* resultou em uma AFE cerca de 20% maior em relação aos tratamentos CO e FU. Esta resposta foi principalmente relacionada a um ganho de 30% da área do limbo foliar pelas plantas tratadas com Malathion. Visto que, a AFE está diretamente e linearmente relacionada com a taxa de crescimento relativo (em biomassa) da planta (Evans, 1972; Mallott & Davy, 1978; Poorter et al., 2009), a pastagem pelos afídeos provavelmente reduziu de forma significativa a capacidade das plantas de *S. alterniflora* de formarem biomassa. Este efeito foi evidenciado nas seções anteriores, quando apontamos a redução da biomassa aérea das hastes principais e do perfilhamento de plantas não tratadas com Malathion e exposta aos afídeos. Resultados ainda mais expressivos de aumento da AFE pelo emprego de pesticidas foram observados por Hatcher et al. (1994) em um experimento com plantas do gênero *Rumex*. As plantas protegidas do ataque de besouros por aplicações do inseticida Dimetoato (grupo dos organofosforados) e do fungicida Benomil (grupo dos benzimidazóis) apresentaram AFE aproximadamente 83% maior do que plantas sob influência desses insetos herbívoros e fungos. Contrastantemente, Mallott & Davy (1978) não observaram diferenças na AFE entre plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) fortemente infestadas pelo afídeo *Rhopalosiphum padi* e plantas crescendo sem a presença de afídeos. Plantas de cevada infestadas por afídeos responderam a pastagem alocando os recursos remanescentes para manutenção da área foliar, em detrimento da formação de perfilhos, resultando em semelhantes áreas foliares específicas entre tratamentos. Este tipo de

resposta não foi observado em *S. alterniflora* que produz extensos rizomas e apresenta uma marcada integração clonal.

A AFE é um atributo muito sensível a quantidade de radiação luminosa disponível e frequentemente uma relação inversa entre estas variáveis é observada (Evans, 1972). Menores valores de AFE e a maior incidência de manchas fúngicas em plantas não tratadas com Malathion poderiam indicar uma interferência na captação de luz pelas folhas recobertas por hifas. A melada produzida por afídeos e outros insetos sugadores pode facilitar o crescimento de fungos e resultar na completa cobertura das folhas por plasma fuliginoso (fumagina) (Newbery, 1980b; Vranjic & Gullan, 1990). Entretanto, este efeito não parece ter ocorrido durante o experimento com *S. alterniflora*, uma vez que não foi observada uma alteração significativa na razão clorofila *a/b*, que é um atributo fisiológico muito sensível a trocas na intensidade da luz (Lichtenthaler et al., 1982). Frequentemente, o aumento do sombreamento resulta na redução na razão clorofila *a/b*, no aumento dos teores de clorofila total e no decréscimo na concentração de carotenóides totais. Os valores da razão clorofila *a/b* entre 1,2 e 1,4 caracterizam um ambiente com baixa intensidade luminosa, compatível com o recobrimento da estufa por cortinas de sombrite durante a maior parte do experimento, de forma a reduzir as altas temperaturas de verão. Essa razão é frequentemente acima de 3,0 para plantas expostas a alta intensidade luminosa (Lichtenthaler & Bushcman, 2001). Entretanto, a maior presença de manchas fúngicas em plantas não tratadas com Malathion não reduziu mais ainda o valor da razão clorofila *a/b*. Os teores foliares médios de clorofila *a* nas bandejas com Malathion (0,85-0,90 mg g⁻¹ peso fresco) foram inferiores ao valor médio de 1,3 mg g⁻¹ peso fresco, relatado por Seneca & Broome (1972) para plântulas de *S. alterniflora* crescendo sob luz artificial em gabinete de cultivo.

Os menores teores de clorofilas e carotenóides em plantas não tratadas com Malathion sugerem que, as diferenças nos teores de pigmentos entre os tratamentos foram principalmente determinadas por perda de parênquima clorofiliano nessas plantas mais expostas aos afídeos, do que a uma menor disponibilidade de radiação (devido a uma maior quantidade de manchas fúngicas recobrindo o limbo foliar). Folhas de *S. alterniflora* pulverizadas com Malathion tiveram teores médios de clorofila *a* aproximadamente 148%

maiores do que dos tratamentos restantes. Conseqüentemente, a ação de um adensamento dos afídeos *H. setariae* em estufa pode acarretar uma depauperação significativa da qualidade de mudas para plantios. Esse impacto dos afídeos, por exemplo, parece ser bem maior do que o do ataque de caramujos *Littoraria irrorata* sobre plantas de *S. alterniflora* em marismas dos E.U.A., onde plantas expostas ao caramujo apresentavam teores foliares médios de clorofila 47% menores do que de plantas de áreas sem caramujos (McFarlin & Alber, 2013). Maneva et al. (2010) também descrevem reduções de 21-27% e de 14-28%, respectivamente, nos teores totais de clorofila e de carotenóides em folhas de duas variedades de cevada atacadas por afídeos, em relação a plantas não expostas a esses insetos. Esses autores também detectaram uma menor taxa fotossintética líquida em plantas expostas a afídeos e relacionaram essa redução a perda de biomassa clorofiliana.

Não foram observados efeitos tóxicos do inseticida Malathion nas plantas de *S. alterniflora* na estufa durante o período experimental. Cumpre destacar que, de acordo com Daehler & Strong (1995), altas frequências de pulverizações de inseticidas nas folhas de *S. alterniflora* podem causar estiolação de folhas (adelgaçamento das paredes celulares e redução no teor de clorofila), principalmente se for aplicado em períodos sob altas temperaturas e penetração solar.

4.4. Respostas foliares ao Daconil

Poucas foram as diferenças significativas no desenvolvimento das plantas de *S. alterniflora* atribuídas exclusivamente a aplicação de fungicida Daconil. O resultado da análise do índice fitossanitário sugere que a aplicação conjunta de pesticidas (IN+FU) resultou em folhas mais saudias (coloração mais “esverdeada”) do que a pulverização exclusiva de Malathion (IN). Resultado este não confirmado pela percentagem de dano foliar estimada através na análise das imagens escaneadas das folhas (Anexo 2), e nem pela observação da frequência de ocorrência de manchas fúngicas nos limbos foliares. A AFE do tratamento IN+FU foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que de IN. Este resultado é compatível com uma possível maior infecção ou resposta a infecção de fungos em IN. Evans (1972; p. 538) destaca que folhas infestadas por fungos demonstram menores valores

de AFE do que de plantas sadias da mesma idade. Esse autor encontrou que essa situação possivelmente é relacionada a uma maturação precoce, com aumento da espessura do limbo, adensamento de vasos condutores e de fibras na parede celular ou a inclusão de biomassa fúngica, e conseqüente elevação da densidade/peso por unidade de área foliar. Alternativamente, Dijkstra (1990) sugere que plantas expostas a herbívoros podem ter redução de sua AFE, devido a produção de compostos secundários para inibir a palatibilidade para esses animais. De qualquer maneira, a aplicação do fungicida Daconil sobre mudas de *S. alterniflora* não afetou a abundância dos afídeos e nem melhorou o desenvolvimento das mudas em relação às bandejas controle. Conseqüentemente, o experimento não encontrou evidências de efeito negativo dos fungos presentes na estufa sobre o desenvolvimento das mudas expostas a afídeos. Em adição, o fungicida Daconil demonstrou ser ineficiente em prevenir a infecção fúngica associada ao ataque dos afídeos.

É importante ressaltar, que os fungos identificados formando manchas fúngicas nas folhas de *S. alterniflora* foram: *Epicoccum nigrum*, *Rhodotorula sp.*, *Aspergillus sp.* e *Penicillium sp.*. O *Epicoccum nigrum* é considerado um fungo saprófito onipresente em ambientes úmidos (e.g. marismas) e sobre vegetação em decomposição (Lobato et al., 2007). Em adição, esses microorganismos são frequentemente encontrados em sementes e inflorescências de *S. alterniflora* (Gessner, 1977). Os fungos do gênero *Rhodotorula sp.*, além de serem encontrados no trato digestório de insetos sugadores (podendo passar para a planta durante a alimentação) (Zacchi & Vaughan-Martini, 2002), também podem infestar folhas de trigo *Triticum aestivum L.* (Larran et al., 2007). Espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* são as mais frequentes em amostras de água do estuário e costa adjacente a Lagoa dos Patos (Silveira, 2012). Espécies de *Penicillium* foram encontradas associadas a folhas em decomposição de *S. alterniflora* e *Scirpus maritimus* em uma marisma do estuário da Lagoa dos Patos (Silveira, 2012). Conforme esta autora, ambas espécies são consideradas na literatura como fungos apodrecedores (eminentemente saprófitos), sendo que espécies de *Penicillium* são patógenos fracos, que em certas ocasiões incidem sobre órgãos de reserva, como sementes e frutos.

O estudo anterior de Sala et al. (2008) também demonstrou que, a adição de Daconil não teve efeito significativo na redução de infecção por fungos em folhas de *S.*

alterniflora em uma marisma. Além disso, as infecções por fungos não atuou como fator influenciando significativamente na produção de biomassa dessas plantas. Os resultados de Rabbinge et al. (1984) demonstraram um baixo efeito do fungicida Captafol (grupo Sulfanilamida) contra fungos na presença de afídeos que excretam abundantemente melada durante a alimentação, em experimentos de campo com folhas de trigo. Contrastantemente, Dik & van Pelt (1992) observaram um melhor desenvolvimento de plantas de trigo expostas a afídeos quando aplicado inseticida (Pirimor) em conjunto com o fungicida (Prochloraz). Estes resultados contraditórios na realidade revelam uma relação complexa entre planta-afídeos-fungos, onde o benefício do controle de fungos com fungicida depende do hábito saprófito ou patogênico do fungo e de sua sensibilidade ao pesticida. Fungos saprófitos consomem rapidamente os carboidratos da melada excretada pelos afídeos, gerando grande biomassa de hifas e competitivamente eliminando recursos para fungos patogênicos (Fokkema et al., 1983). Foi também demonstrado, que grandes abundâncias de melada podem reduzir a efetividade da ação de fungicidas sobre fungos de cereais, porque alguns fungos têm sua tolerância a fungicidas (Dik et al., 1991b), o seu crescimento e a reprodução (Fokkema et al., 1983; Dik & van Pelt, 1992) estimulados pela melada. No caso da aplicação do Daconil em folhas de *S. alterniflora*, a abundante produção de melada pelos afídeos pode ter reduzido a eficiência desse fungicida.

No presente estudo, as 3 bandejas aplicadas com fungicida e inseticida (tratamento protegido de afídeos) apresentaram baixos valores de dano foliar e altos teores totais de clorofilas e carotenóides. Consequentemente, a aplicação de Daconil não teve nenhum efeito tóxico nas plantas de *S. alterniflora*. Vieira et al. (2001) também não observaram nenhuma alteração visual das folhas do mamoeiro *Carica papaya L.*, como branqueamento ou ulcerações, que pudesse ser associar a um efeito tóxico do fungicida Daconil quando aplicado sozinho.

4.5. Variabilidade entre bandejas

Apesar dos efeitos significativos dos pesticidas utilizados na formação de perfilhos e desenvolvimento de plantas de *S. alterniflora*, a maior parte da variabilidade dos

parâmetros biométricos das hastes quantificadas no experimento foi contabilizada por diferenças entre bandejas réplicas dentro de cada tratamento. As temperaturas altas registradas na estufa (média de $33,1 \pm 3,9$ °C) contribuíram para o grande crescimento das mudas de *S. alterniflora*, visto que essa planta C4 apresenta uma maior taxa de crescimento em temperaturas mais elevadas (Cunha et al., 2005; Kirwan et al., 2009). A baixa salinidade da água intersticial das bandejas e a pouca variação deste parâmetro entre bandejas analisadas dos tratamentos também teve pouca significância para o resultado do experimento.

A principal causa da grande variabilidade entre bandejas dentro de cada tratamento foi provavelmente às diferenças no tamanho inicial das mudas obtidas por propagação vegetativa. Ao fragmentar os tufo de hastes das plantas-mãe de *S. alterniflora* para preparar as mudas, há dificuldade para separar rizomas e raízes, o que resulta em biomassas subterrâneas desiguais e conseqüentemente, desempenhos diferenciados em função de, possivelmente, diferentes números de gemas basais e/ou nas reservas nutricionais entre os fragmentos de rizomas obtidos. No solo fertilizado das bandejas, mudas com maior capacidade de obter água e nutrientes ou de produzir mais perfilhos, podem crescer mais rapidamente e assimetricamente em relação a suas vizinhas, que ao final de algumas semanas serão mais baixas e produziram menos folhas (Dickerman & Wetzel, 1985). A percentagem de área foliar danificada e o impacto fitossanitário, que foram parâmetros foliares que avaliaram os danos causados por afídeos e fungos entre tratamentos com pesticidas, contabilizaram apenas uma pequena fração da variabilidade experimental entre bandejas réplicas. Estes últimos resultados sugerem uma independência da distribuição dos afídeos e da ação dos pesticidas na estufa para, respectivamente, atacarem e protegerem folhas em diferentes bandejas.

5. CONCLUSÃO

Através dos diversos resultados apresentados, foi possível demonstrar a grande importância e eficiência do inseticida Malathion contra o impacto do afídeo *H. setariae* sobre mudas de *S. alterniflora* em estufa. A infecção de fungos foi principalmente determinada

pela abundância dos afídeos e o total de área foliar comprometida pela herbivoria. O uso do fungicida Daconil não afetou a densidade de afídeos, o dano foliar dos afídeos, a ocorrência de manchas fúngicas foliares e nem o desenvolvimento das mudas de *S. alterniflora*. Logo, uma alta produtividade de mudas em um curto período de tempo e com menor gasto em insumos pode ser alcançado somente com uso do inseticida.

São necessários estudos adicionais para esclarecer o papel da melada produzida pelo afídeo *H. setariae* no desenvolvimento de manchas fúngicas foliares. Em adição, é recomendável avaliar se fatores ambientais ou bióticos podem determinar a substituição de fungos saprófitos por fungos patogênicos durante infestações desses afídeos, bem como estudos para avaliar a absorção e a acumulação desses pesticidas nas plantas de *S. alterniflora* devem ser realizados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P. J., Ram, S.J., 2004. Biophotonics International 11, 36-42.
- Adam, P., 1993. Saltmarsh ecology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bertness, M.D., Shumway, S.W., 1993. Competition and facilitation in marsh plants. American Naturalist 142, 718-724.
- Bertness, M.D., Crain, C.M., Holdredge, C., Sala, N., 2008. Eutrophication triggers consumer control of New England salt marsh primary production. Conservation Biology 22, 131-139.
- Blackman, R.L., Eastop, V.F., 2000. Aphids on the World's Crops. An Identification and Information Guide. John Wiley and Sons, Chichester.
- Brodsgaard, H.F., Albajes, R., 1999. Insect & mite pests. In: Integrated Pest and Disease Management in Greenhouse Crops. Albajes, R., Gullino, M.L., van Lenteren, J.C., Elad, Y. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 48-60.
- Brown, V.K., Leijn, M., Stinson, C.S., 1987. The experimental manipulation of insect herbivore load by the use of an insecticide (malathion): the effect of application on plant growth. Oecologia 72, 377-381.
- Campbell, A., Mackauer, M., 1975. The effect of parasitism by *Aphidius smithi*

- (Hymenoptera: Aphididae) on reproduction and population growth of the pea aphid (Homoptera: Aphididae). *Canadian Entomologist* 107, 919-926.
- Carson, W.P., Root, R.B., 2000. Herbivory and plant species coexistence: community regulation by an outbreaking phytophagous insect. *Ecological Monographs* 70, 73-99.
- Costa, C.S.B., 2011. Restoration of Coastal Salt marshes in Brazil using Native Salt Marsh Plants. In: Greipsson, S. (Ed.), *Restoration Ecology*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, pp. 333-338.
- Costa, C.S.B., Seeliger, U., 1988. Demografia de folhas de *Hydrocotyle bonariensis* Lam., uma planta herbácea rizomatosa perene, nas dunas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Biologia* 48, 443-451.
- Costa, C.S.B., Davy, A.J., 1992. Coastal salt marsh communities of Latin America. In: Seeliger, U. (Ed.), *Coastal plant communities of Latin America*. Academic Press, San Diego, USA, pp. 179-199.
- Costa, C.S.B., Seeliger, U., Oliveira, C.P.L, Mazo, A.M.M., 1997. Distribuição, funções e valores das marismas e pradarias submersas no estuário da Lagoa dos Patos (RS, Brasil). *Atlântica* 19, 65-83.
- Costa, C.S.B., Marangoni, J.C., Azevedo, A.M.G., 2003. Plant zonation in irregularly flooded salt marshes: relative importance of stress tolerance and biological interactions. *Journal of Ecology* 91, 951-965.
- Costa, C.S.B., Iribarne, O.O., Farina, J.M., 2009. Human impacts and threats to the conservation of South American salt marshes. In: Silliman, B.R., Grosholtz, T., Bertness, M.D. (Eds.), *Salt Marshes under Global Siege*. University of California Press, Berkley, pp. 337-359.
- Chan, C.K., Forbes, A.R., Raworth, D.A., 1991. Aphid-transmitted viruses and their vectors of the world. *Agriculture Canada, British Columbia Technical Bulletin*, Vancouver.
- Choudhury, D., 1985. Aphid honeydew - a re-appraisal of Owen and Wiegert's hypothesis. *Oikos* 45, 287-289.
- Chung, C.H., 2006. Forty years of ecological engineering with *Spartina* plantations in China. *Ecol. Engineering*. 27, 49-57.
- Cunha, S.R., Asmus, M., Costa, C.S.B., 2005. Production dynamics of *Spartina alterniflora*

- salt marshes in the estuary of the Patos Lagoon (RS, Brazil): A simulation model approach. *Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology* 2, 75-85.
- Daehler, C.C., Strong, D.R., 1995. Impact of high herbivore densities on introduced smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*, invading San Francisco Bay, California. *Estuaries* 18, 409-417.
- De Berardinis, E., Baronio, P., Baumgartner, J., 1994. The effect of aphid (*Dysaphis plantaginea* Pass., Hom., Aphididae) feeding on apple fruit growth. *Ecological Modelling* 72, 115–127.
- Deng, Z., An, S., Zhao, C., Chen, L., Zhou, C., Zhi, Y., Li, H., 2008. Sediment burial stimulates the growth and propagule production of *Spartina alterniflora* Loisel. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 76, 818-826.
- Dickerman, J., Wetzel, R.J., 1985. Clonal growth in *Typha latifolia*: population dynamics and demography of ramets. *Journal of Ecology* 73, 535-552.
- Dijkstra, P., 1990. Cause and effect of differences in specific leaf area. In: Lambers, H., Cambridge, M.L., Konings, H., Pons, T.L. (Eds.), *Causes and Consequences of Variation in Growth Rate and Productivity of Higher Plants*. Academic Press, The Hague, The Netherlands, pp. 125-140.
- Dik, A.J., van Pelt, J.A., 1992. Interaction between phyllosphere yeasts, aphid honeydew and fungicide effectiveness in wheat under field conditions. *Plant Pathology* 41, 661-675.
- Dik, A.J., Fokkema, N.J., van Pelt, J.A., 1991b. Consumption of aphid honeydew, a yield reduction factor, by phyllosphere yeasts under field conditions. *Journal of Plant Pathology* 97, 209-232.
- Dixon, A.F.G., 1987. Seasonal development in aphids. In: Minks, A.K., Harrewijn, P. (Eds.), *Aphids, their Biology, Natural Enemies & Control*. Vol. 2A. Elsevier, Amsterdam, pp. 315-320.
- Dixon, A. F. G. 1998 *Aphid ecology: an optimisation approach*. Chapman and Hall, London, UK.
- Evans, G.C., 1972. *The Quantitative Analysis of Plant Growth*. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

- Fokkema, N.J., Riphagen, I., Poot, R.J., de Jong, C., 1983. Aphid honeydew, a potential stimulant of *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum* and the competitive role of saprophytic mycoflora. *Transactions of the British Mycological Society* 81, 355-363.
- García-Guzmán, G., Dirzo, R., 2001. Patterns of leaf-pathogen infection in the understory of a Mexican rain forest: incidence, spatiotemporal variation, and mechanisms of infection. *American Journal of Botany* 88, 634-635.
- Gessner, R.V., 1977. Seasonal occurrence and distribution of fungi associated with *Spartina alterniflora* from a Rhode Island estuary. *Mycologia* 69, 477-491.
- Godfrey, L.D., Rosenheim, J.A., Goodell, P., 2000. Cotton aphid emerges as major pests in SJV cotton. *California Agriculture* 54, 26-29.
- Hammon, K.E., Faeth, S.H., 1992. Ecology of plant-herbivore communities: A fungal component? *Natural Toxins* 1, 1197-208.
- Hatcher, P.E., Paul, N.D., Ayres, P.G., Whittaker, J.B., 1997. Added soil nitrogen does not allow *Rumex obtusifolios* to escape the effects of insect fungus interactions. *Journal of Applied Ecology* 34, 88-100.
- Ho, C.K., Pennings, S.C., 2008. Consequences of omnivory for trophic interactions on a salt marsh shrub. *Ecology* 89, 1714-1722.
- Ihara, 2014. Bula do fungicida Daconil-BR (IHARA - Agricultura é a nossa vida), <http://www.ihara.com.br/upload/produtos/bula/1349202613.pdf> (7 April 2014).
- Ingram, J.W., Summers, E.M., 1936. Transmission of sugarcane mosaic by the rusty plum aphid, *Hysteroneura setariae* (Thom.). *Journal of Agricultural Research* 52, 879-887.
- Insetimax, 2014. Bula do inseticida Malathion 500 CE (Insetimax - Indústria Química), http://www.insetimax.com.br/site/FICHAS/FICHA_TEC_MALATHION_500_CE.pdf
- Jahn, G.C., Almazan, L.P., Pacia, J.B., 2005. Effect of nitrogen fertilizer on the intrinsic rate of increase of *Hysteroneura setariae* (Thomas) (Homoptera: Aphididae) on rice (*Oryza sativa* L.). *Environmental Entomology* 34, 938-943.
- Jansson, J., 2003. The Influence of Plant Fertilisation Regime on Plant-aphid-parasitoid Interactions. PhD thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Kirwan, M.L., Guntenspergen, G.R., Morris, J.T., 2009. Latitudinal trends in *Spartina*

- alterniflora* productivity and the response of coastal marshes to global change. *Global Change Biology* 15, 1982-1989.
- Koricheva, J., Larsson, S., Haukioja, E., Keinanen, M., 1998. Regulation of woody plant metabolism by resource availability: hypothesis testing by means of a meta-analysis. *Oikos* 83, 212-226.
- Larran, S., Perelló, A., Simon, M.R., Moreno, V., 2007. The endophytic fungi from wheat (*Triticum aestivum* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 23, 565-572.
- Leal, C.S., Marangoni, J.C., Costa, C.S.B., 2011. Otimização da produção de mudas de *Spartina alterniflora* Loisel. (Poaceae) em casa de vegetação. In: Resumos do XIV Encontro de Botânicos do Rio Grande do Sul. Sociedade Botânica do Brasil (SBB)-Feevale, Novo Hamburgo, RS., pp. 246-247.
- Lichtenthaler, H.K., Buschmann, C., 2001. Chlorophylls and carotenoids - measurement and characterisation by UV-VIS. *Current protocols in food analytical chemistry (CPFA)*, (Supplement 1). John Wiley, New York, pp. F4.3.1–F 4.3.8.
- Lichtenthaler, H.K., Kuhn, G., Prenzel, U., Buschmann, C., Meier, D., 1982. Adaptation of chloroplast-ultrastructure and of chlorophyll-protein levels to high-light and low-light growth conditions. *Zeitschrift für Naturforschung* 37c, 464-475.
- Lobato, R.C, Silveira, E.S., Costa, C.S.B., 2007. Mancha Foliar Fúngica em *Spartina densiflora*. In: IX Jornada Biológica, Rio Grande-RS. IX Jornada Biológica: Programas e Resumos. Ed FURG, Rio Grande, p. 52.
- Mallott, P.G., Davy, A.J., 1978. Analysis of effects of the bird cherry-oat aphid on the growth of barley: unrestricted infestation. *New Phytologist* 80, 209-218.
- Maneva, V., Lecheva, I., Vassilev, A., Semerdjieva, I., 2010. Changes in the photosynthetic performance of infested leaves of two barley cultivars by aphids. 45th Croatian and 5th International Symposium on Agriculture, pp. 831-836.
- Marczak, L.B., Ho, C.-K, Wieski, K., Vu, H., Denno, R.F., Pennings, S.C., 2011. Latitudinal variation in top-down and bottom-up control of a salt marsh food web. *Ecology* 92, 276-281.
- Marin, S.L.D., 1988. Efeitos fitotóxicos de inseticidas, acaricidas e fungicidas em mudas de

- mamoeiro (*Carica papaya L.*) cv. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Martin, H., Worthing, C.R., 1976. Insecticide and fungicide handbook. Blackwell, Oxford.
- McFarlin, C.R., Alber, M., 2013. Foliar DMSO:DMSP ratio and metal content as indicators of stress in *Spartina alterniflora*. Marine Ecology Progress series 474, 1-13.
- Mendonça, P.T., Costa, C.S.B., 2008. Efeitos da disponibilidade de nitrogênio e fósforo no estabelecimento de *Spartina alterniflora* em um plano entremarés irregularmente alagado. Neotropical Biology and Conservation 3, 135-148.
- Miles, P.W., 1987b. Feeding process of Aphidoidea in relation to effects on their food plants. In: Minks, A.K., Harrewijn, P. (Eds.), Aphids, their Biology, Natural Enemies and Control, Elsevier, Amsterdam, pp. 321-339.
- Newbery, D.McC., 1980b. Interactions between the coccid, *Icerya seychellarum* (Westw.), and its host tree species on Aldabra atoll II. *Scaevola taccada* (Gaertn.) Roxb. Oecologia 46, 180-185.
- Poorter, H., Garnier, E., 1999. Ecological significance of inherent variation in relative growth rate and its components. Pugnaire, F.I., Valladares, F. (Eds.), Handbook of Functional Plant Ecology, Marcel Dekker, New York, pp. 81-120.
- Poorter, H., Niinemets, U., Poorter, L., Wright, I.J., Villar, R., 2009. Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. New Phytologist 182, 565-588
- Rabbinge, R., Bouwer, A., Fokkema, N.J., Sinke, J., Stomph, T.J., 1984. Effects of the saprophytic leaf mycoflora on growth & productivity of winter wheat. Netherlands Journal of Plant Pathology 90, 181-197.
- Reed, T.D., Semtner, P.J., 1992. Effects of tobacco aphid (Homoptera: Aphididae) populations on flue-cured tobacco production. Journal of Economic Entomology 85, 1963-1971.
- Rossi, A.M., Stilling, P., 1998. The interactions of plant clone and abiotic factors on a gall-making midge. Oecologia 116, 170-176.
- Saikkonen, K., Faeth, S.H., Helander, M., Sullivan, T.J., 1998. Fungal endophytes: a continuum of interactions with host plants. Annual Review of Ecology and

Systematics 29, 319-343

- Sala, N.M., Bertness, M.D., Silliman, B.R., 2008. The dynamics of bottom-up and top-down control in a New England salt marsh. *Oikos* 117, 1050-1056.
- Salgado, C.S., Pennings, S.C. 2005. Latitudinal variation in palatability of salt-marsh plants: are differences constitutive? *Ecology* 86, 1571-1579.
- Seneca, E.D, Broome, S.W., 1972. Seedling response to photoperiod and temperature by smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*, from Oregon Inlet, North Carolina. *Chesapeake Science* 13, 212-15
- Silliman, B.R., Newell, S.Y., 2003. Fungal-farming in a snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 100, 15643-15648.
- Silveira, E.S., 2012. Fungos e leveduras na água e plantas macrófitas em decomposição na região estuarina da Lagoa dos Patos e praia do Cassino, RS - Brasil. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Terhune, BT, Allen, E.A., Hoch, H.C., Wergin, W.P., Erbe, E.F., 1991. Stomatal ontogeny and morphology in *Phaseolus vulgaris* in relation to infection structure initiation by *Uromyces appendiculatus*. *Canadian Journal of Botany* 69, 477-484.
- Vieira, A., Ruggiero, C., Marin, S.L.D., 2001. Fitotoxicidade de fungicidas, acaricidas e inseticidas, sobre o mamoeiro (*Carica papaya* L.) Cultivar Sunrise Solo Improved Line 72/12 em condições de campo. *Revista Brasileira de Fruticultura* 23, 315-319.
- Vince, S.W., Valiela, I., Teal, J.M., 1981. An experimental study of the structure of herbivorous insect communities in a salt marsh. *Ecology* 62, 662-678.
- Vranjic, J.A., Gullan, P.J., 1990. The effect of a sap-sucking herbivore, *Eriococcus coriaceus* (Homoptera: Eriococcidae), on seedling growth and architecture in *Eucalyptus blakelyi*. *Oikos* 59, 157-162.
- Whitehead, R., 1997. *The UK pesticide guide*. CAB International/BCPC, Wallingford, Oxon.
- Zacchi, L., Vaughan-Martini, A.E., 2002. Yeasts associated with insects in agricultural areas of Perugia, Italy. *Annals of Microbiology* 52, 237-244.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice-Hall, New Jersey.

Universidade Federal do Rio Grande - FURG
Programa de Pós Graduação em Aquicultura
Instituto de Oceanografia

CAPÍTULO II

Efeitos do controle da herbivoria pelo caranguejo *Neohelice granulata* e de fungos associados a lesões foliares no desenvolvimento de plantas de *Spartina alterniflora* transplantadas em um plano entremarés

Ricardo Franco Freitas

O presente capítulo está apresentado de acordo com as normas para submissão da revista *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*

RESUMO

A sobrevivência e o crescimento de mudas recém-transplantadas da grama bioengenhreira de marismas *S. alterniflora* podem ser gravemente afetados pela ação do caranguejo *Neohelice granulata*, que se alimenta de suas folhas, e por infecções de fungos provocadas por esses herbívoros ao longo da costa do sudoeste Atlântico. Os efeitos no sucesso do estabelecimento de mudas de *S. alterniflora* através do controle da herbivoria por caranguejos e da infecção de fungos foram avaliados através de dois experimentos fatoriais com gaiolas de exclusão e aplicação de um fungicida, em uma marisma recém-criada na Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS). O uso das gaiolas de exclusão foi altamente eficiente contra o ataque de caranguejos *N. granulata* ao longo dos 2 experimentos realizados. A pastagem por esses caranguejos nas gaiolas vazadas reduziu significativamente sua sobrevivência e o desenvolvimento das mudas. Enquanto 100% das mudas de *S. alterniflora* protegidas com gaiolas de exclusão sobreviveram, nas gaiolas vazadas a sobrevivência das mudas reduziu para 65%. Lesões simuladas de *N. granulata* mostraram poder facilitar na infecção de fungos, principalmente das plantas recém-transplantadas, em que suas biomassas fúngicas foram 50% maiores do que o das folhas lesionadas das plantas rebrotadas. Em adição, pode ser dito que esses microorganismos não influenciaram nos parâmetros biométricos das plantas de *S. alterniflora* em uma zona entremarés da Ilha da Pólvora. A aplicação do fungicida Daconil reduziu cerca de 50% da biomassa fúngica de folhas lesionadas em relação àquelas com lesões e sem uso desse pesticida. Por fim, esse fungicida também não afetou o desenvolvimento das plantas nos 2 experimentos desenvolvidos.

ABSTRACT

Along the southwest Atlantic coast, the survival and growth of newly transplanted propagules of the bioengineer saltmarsh cordgrass *S. alterniflora* on the intertidal zone can be seriously affected by the action of the *Neohelice granulata* crabs, which feed on their leaves and may induce fungal infections of the wounded tissues. The effects on the establishment success of *S. alterniflora* vegetative propagules by *Neohelice granulata* crabs herbivory and fungal infection facilitated by crabs' grazing scars were evaluated by 2 factorial experiments, using cages to exclude crabs and spraying of the fungicide Daconil BR. These experiments were carried out in a newly created salt marsh at “Ilha da Pólvora” (Rio Grande, RS). The use of exclusion cage was highly effective to protect *S. alterniflora* against the attack by crabs *N. granulata* during both experiments. The grazing by crabs in open cages significantly reduced the survival and growth of the propagules. While 100% of *S. alterniflora* propagules protected from crabs' grazing by exclusion cages survived, in open cages propagules survival decreased to 65 %. Simulated wounds of *N. granulata* facilitate the foliar infection of fungi, particularly on the newly transplanted propagules, where fungal biomass was 50% greater than the wounded leaves of 2-months older propagules. The wounded leaves with fungicide and intact leaves without fungicide had mean values of fungal biomass up to 70% lower than wounded leaves not protected by fungicide. Finally, fungicide application and thus fungi infection did not significantly affect the development and survival of *S. alterniflora* propagules during the 2 field experiments.

1. INTRODUÇÃO

Transplantes da grama bioengenhreira de marismas *Spartina alterniflora* (Poaceae), visando à criação de habitats ou proteção da costa contra processos erosivos (Chung, 2006; Marangoni & Costa, 2012), podem ser feitos em pequena, média ou larga escala, utilizando como unidade de propagação tanto sementes como material vegetativo, obtidos de ambientes naturais ou produzidos em viveiros (Woodhouse & Knutson, 1982; Mendonça & Costa, 2008).

Um dos estágios mais críticos para o sucesso de um projeto de restauração ou criação de marismas é o estabelecimento de plantas bioengenheiras no ambiente entremarés. Diversos estudos têm demonstrado a maior sensibilidade das plantas jovens de *Spartina* a diversos fatores abióticos (alta frequência de alagamento, baixos potenciais de oxidação-redução, altas salinidades, etc.) (Bertness, 1991; Adam, 1993; Castillo et al., 2005; Chung, 2006). Entretanto, no ambiente natural, a sobrevivência e o crescimento das mudas podem ser gravemente afetados pela ação de invertebrados herbívoros e de infecções de fungos. Em marismas do sul dos EUA, por exemplo, o caramujo *Littoraria irrorata* que pastoreia sobre *Spartina alterniflora*, pode depauperar grandes áreas de marismas se presentes em altas densidades (Silliman & Zieman, 2001; Silliman & Newell, 2003; Silliman et al., 2005). Quando a ação de um herbívoro não causa lesões fatais às plantas, ela resulta em remoção de carbono e nutrientes, bem como na ativação de mecanismos de cicatrização ou abscisão do tecido afetado (Nykanen & Korechiva, 2004). Logo, a herbivoria pode limitar o crescimento das plantas afetadas, reduzindo sua biomassa e/ou altura das hastes (Silliman & Zieman, 2001; Silliman & Newell, 2003; Costa et al., 2003; Alberti et al., 2007). Adicionalmente, as lesões ocasionadas por herbívoros podem facilitar a infecção por fungos, vírus e bactérias em diversos ambientes, especialmente quando eles pastam folhas novas (García-Guzmán & Dirzo, 2001). Infecções de fungos também têm sido associadas à degeneração progressiva da vegetação de várias áreas de marismas (“marsh dieback vegetation”) dominadas por espécies de *Spartina* na América do Norte (Silliman et al., 2005).

Ao longo da costa do sudoeste Atlântico, o caranguejo cavador *Neohelice granulata*

(Dana 1851) é uma das espécies mais importantes de macroinvertebrados. Alimenta-se de invertebrados bentônicos, detritos e também pasta sobre plantas de marismas, principalmente de hastes vivas (colmos) das gramas do gênero *Spartina* (Costa et al., 2003; Alberti et al., 2007; Daleo et al., 2009) (Anexo 3). Esse caranguejo que atinge um diâmetro da carapaça de até 40 mm (Spivak et al., 1994), é distribuído desde o sudeste do Brasil (23° S) até o norte da Patagônia na Argentina (41° S) (Iribarne et al., 2003), sendo capaz de sobreviver inclusive em condições hipersalinas (Iribarne et al., 2005). No estuário da Lagoa dos Patos (RS, Brasil), marismas e planos de lama entremarés são densamente habitados por *N. granulata* (até 100 indivíduos por m²; D’Incao et al., 1992).

O pastoreio por *N. granulata* diminui a sobrevivência de plantas jovens das gramas *S. densiflora* e *S. alterniflora* (Costa et al., 2003; Alberti et al., 2007; Daleo et al., 2009) e pode afetar o sucesso de projetos de restauração/criação de marismas (Costa, 2011). Mais de 50% das plantas transplantadas enraizadas em planos de lama na parte baixa do entremarés podem ser mortas por predação de *N. granulata* (Costa & Marangoni, 1997; Costa et al., 2003; Marangoni & Costa, 2012). A *S. alterniflora* sofre uma maior intensidade de pastoreio pelo *N. granulata* do que a *S. densiflora* (Costa et al., 2003; Alberti et al., 2007), o que parece estar relacionado a seus maiores teores de compostos nitrogenados no tecido e menor fibrosidade.

Experimentos no NE da costa argentina (Daleo et al., 2009), demonstraram que a herbivoria de *N. granulata* pode induzir a infecção de fungos nas folhas de *S. alterniflora* e *S. densiflora*, não observada em folhas intactas. Além disso, a aplicação de fungicida pode reduzir a infecção de folhas danificadas. Esses mesmos autores também relataram que a prevenção da infecção de fungos pela aplicação de fungicida nas folhas feridas resultou em aumento do desenvolvimento das plantas, tanto em número de hastes, como em termos de biomassa aérea viva e total produzidas. Este trabalho (Daleo et al., 2009) foi realizado em uma marisma madura densamente vegetada e não existem informações sobre o impacto da infecção de fungos, induzida pelo caranguejo, em áreas do entremarés sendo colonizadas por *Spartina* (marismas em formação).

Se o pastoreio por caranguejos sobre plantas do gênero *Spartina* pode facilitar a infecção por fungos durante o estabelecimento dessas plantas em novas áreas de marismas,

parte da mortalidade atribuída à ação direta do *N. granulata* poderia ser, na realidade, ocasionada pelos fungos. Esta interação biológica poderia limitar o sucesso de projetos de restauração/criação de marismas envolvendo o plantio dessas gramas bioengenheiras nessa região do Atlântico. O presente trabalho teve como objetivo quantificar as importâncias relativas do pastoreio pelo caranguejo *N. granulata* e da infecção de fungos em lesões induzidas por esse herbívoro na mortalidade e no desenvolvimento de mudas de *S. alterniflora* recém-estabelecida na zona entremarés. Este estudo foi desenvolvido em uma área de marisma a partir de dois experimentos fatoriais de transplante de plantas com a utilização de gaiolas de exclusão de caranguejos e da aplicação de um fungicida genérico. São testadas as seguintes hipóteses: (1) a herbivoria do caranguejo facilita a infecção fúngica foliar em plantas de *S. alterniflora*; (2) a infecção fúngica em lesões por si é determinante da sobrevivência e do desenvolvimento das mudas; (3) este papel da infecção fúngica é influenciado pela intensidade de herbivoria (efeito sinérgico); (4) o tamanho das mudas influencia na sensibilidade das plantas de *S. alterniflora* a herbivoria e infecção fúngica. Adicionalmente, é discutida a necessidade do emprego de mecanismos de exclusão de caranguejos e de fungicidas em projetos de restauração de marismas através do plantio de *S. alterniflora* no SW do Atlântico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de estudo

Dois experimentos foram realizados em um plano arenolodoso com baixa cobertura vegetal na zona entremarés na Ilha da Pólvora (Rio Grande - RS; 32° 01' S, 52° 06' W), localizada na porção mediana do estuário da Lagoa dos Patos. O plano entremarés localizava-se a -23 cm do nível médio da lagoa (média de dados diários dos últimos 15 anos; fonte PELD - Programa de Pesquisas Ecológicas de Longa Duração FURG/CNPq), tendo uma umidade do solo homogêneo. A Ilha da Pólvora possui cerca de 45 hectares, quase toda área coberta por marismas, e uma elevação máxima de cerca de 60 cm acima do nível médio da Lagoa dos Patos. A densa cobertura vegetal é dominada por gramas do

gênero *Spartina* e tiriricas (ciperáceas) (Costa et al., 2003), sendo o caranguejo *N. granulata* o mais importante decápodo da zona entremarés (Costa et al., 2003; Rosa & Bemvenuti, 2004). Silveira (2012) demonstrou uma grande diversidade de fungos e leveduras crescendo sobre o detrito vegetal e folhas vivas de *S. alterniflora* durante o verão/outono, onde as espécies mais frequentes são fungos ascomicetos (filo Ascomycota). O presente estuário apresenta um clima temperado quente com forte sazonalidade do fotoperíodo, radiação solar e temperatura (Costa et al., 1988; Mata & Moller, 1993). Já o seu padrão hidrológico é caracterizado por um regime de micromarés (0,5 m), irregularmente inundado com forte componente meteorológico. É notável a componente sazonal da precipitação, com invernos chuvosos acarretando grandes vazões e águas altas, além de verões secos com águas baixas e salinas (Costa et al., 1988, 2003; Moller et al., 2009).

3.2. Experimento 1 - Herbivoria por caranguejos e infecção por fungos em plantas recém-estabelecidas

Em novembro de 2012, foram transplantadas 60 mudas de *S. alterniflora* no plano entremarés da Ilha da Pólvora. O plantio das mudas (todas com alturas entre 40 e 55 cm) foi efetuado com um espaçamento de 1 m e cada muda foi composta por 2 hastes (perfilhos) interconectadas por rizoma com raízes. Após o plantio, as mudas foram designadas aleatoriamente a 6 grupos de 10 mudas, submetidos a diferentes tratamentos experimentais (Anexos 4 e 5). As mudas de 4 grupos foram individualmente protegidas do pastoreio natural por *N. granulata* através de gaiolas de exclusão (cilíndricas com 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura, revestida com tela de aço galvanizada com malha de 3 mm). Dois grupos protegidos por gaiolas de exclusão tiveram suas mudas submetidas a lesões simuladas do pastoreio de *N. granulata*, que foram confeccionadas através de 3 incisões paralelas no limbo foliar com bisturi (Anexo 6). Este aspecto de dilaceração foliar pelo caranguejo é comumente observado no estuário da Lagoa dos Patos e descrito por outros autores (Bortolus & Iribarne, 1999; Alberti et al., 2007). Para cada muda, 2 folhas foram lesionadas (uma folha de cada haste), com incisões que englobaram uma área de 4 cm² de

cada folha. Considerando o número médio inicial de 4 folhas por haste e um comprimento médio das folhas de 25 cm nas mudas de *S. alterniflora*, as lesões representaram um dano de cerca de 50% das folhas ou 20% da área foliar inicial das mudas. Nos 2 grupos protegidos por gaiolas de exclusão remanescentes, as mudas não sofreram lesões. Um dos grupos com mudas lesionadas e um dos grupos com mudas não lesionadas foram pulverizados semanalmente com fungicida genérico Daconil BR (1,5 g L⁻¹ dissolvida na água do estuário; aplicado em períodos com maré baixa) para prevenir a infecção de fungos.

Conseqüentemente, essas plantas em gaiolas de exclusão foram relacionadas aos seguintes tratamentos: lesões simuladas do caranguejo e aplicação de fungicida (ELF); lesões simuladas do caranguejo e sem aplicação de fungicida (EL); sem lesões do caranguejo e aplicação de fungicida (EF); sem lesões do caranguejo e sem aplicação de fungicida (EX). Adicionalmente, os 2 grupos remanescentes de 10 mudas tiveram cada muda plantada circundada por gaiola de exclusão (20 cm de diâmetro e 60 cm) com tela galvanizada vazada, isto é, recobrando apenas metade da superfície do cilindro da estrutura da gaiola. Este procedimento visou fornecer um controle do artefato da gaiola de exclusão, sendo as mudas vulneráveis ao pastoreio natural pela população local de *N. granulata*. Um dos grupos de mudas de gaiolas vazadas (n = 10) recebeu pulverizações semanais do fungicida descrita anteriormente (VF) e o segundo grupo não recebeu a aplicação de fungicida (VA). Semanalmente, as gaiolas foram vistoriadas quanto a presença de recrutas de caranguejos (que foram removidos das exclusões quando encontrados). No desenho amostral utilizado, gaiolas vazadas expostas aos caranguejos, gaiolas protegidas com lesões induzidas e gaiolas protegidas sem lesões representam um gradiente de redução da intensidade de herbivoria, bem como a aplicação e não de fungicida determinam diferentes intensidades de infestação por fungos. Conseqüentemente, o efeito sinérgico da intensidade da herbivoria na infecção fúngica e desenvolvimento das mudas pode ser avaliado.

A aplicação do Daconil (total de 4,5 g L⁻¹ em 21 dias) esteve dentro dos valores utilizado por Silliman & Newell (2003) para *S. alterniflora*. A quantidade foi em torno de 10% abaixo do limite recomendado para o controle de infecção fúngica em gramíneas pelo fabricante do Daconil BR (Ihara, 2014). Adicionalmente, experimentos preliminares

desenvolvidos por Silliman & Newell (2003) e Sala et al. (2008), demonstraram que a aplicação de Daconil em plantas de *S. alterniflora* sadias não afetou o seu crescimento em marismas da América do Norte, bem como, não teve efeitos tóxicos agudos sobre caramujos herbívoros de marismas (B.R. Silliman, Duke University, Com. Pess).

Durante o período do experimento, foram obtidos dados diários da salinidade (refratômetro) e nível da água do estuário (régua graduada) na estação de monitoramento do PELD (32° 05' S, 52° 10' W; 1 km ao norte do local do experimento) e as temperaturas do ar na Estação Automática INMET (Instituto Nacional de Meteorologia; 9 km do local do experimento). Semanalmente, também foram quantificados no plano de lama entremarés, o nível da água (régua graduada), a salinidade do sedimento com uso de um condutivímetro digital (Hanna - Modelo HI 9835) (estimada no extrato 2:1 de sedimento e água destilada; expresso como g sal kg solo⁻¹ a partir da relação de conversão 52 dS m⁻¹ = 35 gNaCl L⁻¹) em 3 diferentes pontos da área experimental e a temperaturas do ar no interior de 1 gaiola vazada e 1 gaiola de exclusão. No dia do estabelecimento do experimento, foram quantificados os seguintes parâmetros: altura inicial (com régua em cm), número de folhas vivas e de perfilhos da haste principal das mudas transplantadas. Os tratamentos foram mantidos por 21 dias e após este período foram avaliados os seguintes parâmetros das mudas: sobrevivência (%), altura final, número de folhas vivas e número de perfilhos. Todas as mudas foram coletadas (corte com tesoura) para estimar a biomassa aérea seca de cada muda (expressa em g m⁻²) realizada posteriormente em balança analítica após secagem em estufa por 72 horas a 60 °C. Uma vez que a densidade de herbívoros pode estar relacionada à intensidade da herbivoria (Lubchenco, 1983), foram também quantificadas a densidade de tocas em um quadrat de 1 m² ao redor de cada gaiola (parâmetro considerado um estimador da densidade dos indivíduos de *N. granulata*; Alberti et al., 2007).

3.3. Experimento 2 - Impacto de lesões do pastoreio de *N. granulata* sobre o desenvolvimento de hastes e na infecção fúngica de suas folhas de propágulos já estabelecidos e recém-transplantados

Em março de 2013, foram transplantadas vinte mudas vegetativas de *S. alterniflora*

no mesmo plano entremarés onde o Experimento 1 foi realizado. As características das mudas e o espaçamento de plantio foram os mesmos do experimento 1. Todas as plantas foram mantidas protegidas do pastoreio por *N. granulata* através de gaiolas de exclusão com tela galvanizada (as mesmas utilizadas no Experimento 1). Concomitantemente, foram selecionados vinte tufos de *S. alterniflora* de plantas utilizadas no Experimento 1. Todos os tufos selecionados eram plantas que cresceram nas gaiolas de exclusão com tela após o corte de todas as hastes no final do Experimento 1, conseqüentemente foram mantidas protegidas da herbivoria por *N. granulata* nos 2 meses após a coleta. Estas plantas doravante serão chamadas de “rebrotos”, uma vez que cresceram do brotamento dos meristemas basais da grama após o corte. Cada tufo de rebrote possuía em torno de 9 hastes. Para cada tipo de propágulo estabelecido (mudas recém-transplantadas e rebrotos) foram designados, aleatoriamente, 4 grupos de 5 gaiolas com plantas, e submetidos a diferentes tratamentos experimentais. Em cada gaiola, 2 perfilhos de tamanhos e número de folhas semelhantes foram marcadas com fio elétrico encapado, sendo 1 perfilho submetido a lesões simuladas do pastoreio de *N. granulata* (iguais do Experimento 1) com bisturi (Anexo 6) em 2 folhas. As lesões representaram cerca de 70% das folhas por haste ou 30% da área foliar inicial das mudas recém-transplantadas (logo, teve um maior impacto na planta do que o Experimento 1). De forma a avaliar os efeitos da infecção de fungos nas hastes de *Spartina*, metade das mudas rebrotadas e metade das transplantadas (n = 10 de cada) foram pulverizadas a cada 5 dias com fungicida genérico Daconil BR (1,5 g L⁻¹ dissolvida na água do estuário; aplicado em períodos com maré baixa).

Por conseguinte, as plantas dos 2 tipos de propágulos foram associadas aos seguintes tratamentos: a) rebrotos com lesões foliares simuladas do caranguejo em presença (ERLF) ou ausência do fungicida (ERL); b) rebrotos sem lesões foliares em presença (ERF) ou ausência fungicida (ER); c) mudas transplantadas com lesões foliares simuladas do caranguejo em presença (ETLF) ou ausência de fungicida (ETL); d) mudas transplantadas sem lesões foliares com (ETF) ou sem fungicida (ET) (Anexo 7). A cada 5 dias, as gaiolas foram vistoriadas quanto à presença de recrutas de caranguejos (removidos das exclusões se encontrados).

Durante o período do experimento foram obtidos os mesmos dados meteorológicos

e abióticos quantificados no Experimento 1. No início do Experimento 2, foram quantificados os seguintes parâmetros: altura (com régua graduada em cm) e número de folhas vivas dos 2 perfílios marcados (com e sem lesão foliar), bem como o número de perfílios de cada gaiola. Após 35 dias, as hastes marcadas foram novamente medidas e os seguintes parâmetros determinados através da diferença entre as medições inicial e final de cada haste: formação de perfílios por gaiola, crescimento vertical (cm; 35 dias⁻¹) e formação foliar.

3.4. Uso do ergosterol como medida de biomassa fúngica e a percentagem de área foliar danificada em *S. alterniflora*

Após o término do Experimento 1 (21 dias), foram aleatoriamente escolhidas e coletadas doze folhas das mudas de *S. alterniflora* dos tratamentos protegidos do ataque de caranguejos EX, ELF e EL. Cada folha com cerca de 0,10 g peso fresco e comprimento de 10 cm foi colocada em sacos individuais. Após a coleta, todas as folhas foram mantidas no escuro e resfriadas até serem levadas ao laboratório. Não foram realizadas análises de ergosterol nas folhas do tratamento EF (não lesionadas pulverizadas com fungicida) devido à ausência de diferença na biomassa fúngica entre folhas sadias (sem lesões) de *S. alterniflora* tratadas com ou sem fungicida, demonstrada por Silliman & Newell (2003). Adicionalmente, Daleo et al., (2009) também não observaram a presença de manchas fúngicas em folhas sadias de *S. alterniflora* nas marismas da costa Argentina.

No laboratório, a superfície das folhas foi observada com uma lupa manual (10x) e a percentagem de área foliar danificada (%) estimada visualmente. Após isso, elas foram estocadas individualmente em frascos âmbar com metanol 100% e transferidas para um freezer (-10 °C) no Laboratório de Biotecnologia de Halófitas (IO-FURG). Este procedimento visou a preservação do ergosterol (esterol presente na membrana celular dos fungos) nas amostras (Newell, 1995). O ergosterol é considerado uma boa medida de crescimento fúngico (Anderson et al., 1994), em decorrência dele ter uma alta relação com a biomassa metabolicamente ativa dos fungos.

A biomassa fúngica de cada amostra foi quantificada através do teor de ergosterol

($\mu\text{g erg g}^{-1}$, peso fresco), usando uma metodologia adaptada por Newell et al. (1988) no Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos (Escola de Química e Alimentos - FURG). A concentração de ergosterol foi quantificada a partir dos extratos das folhas em metanol 100% lidos em um HPLC/UV (marca Shimadzu) com coluna C18, 4,6 x 250 mm, 5 μm , em um comprimento de onda de 282 nm. A fase móvel utilizada foi metanol 100%, com vazão de 0,8 mL min^{-1} . A análise cromatográfica foi de 15 minutos, em que o ergosterol foi identificado em um tempo de retenção de 12,8 minutos.

Ao final do Experimento 2 (após 35 dias), também foram aleatoriamente escolhidas e coletadas 6 folhas de cada tratamento. Em relação às plantas rebrotadas, foram analisadas as folhas dos tratamentos ERLF, ERL e ER. Foram também analisadas as folhas das plantas transplantadas dos tratamentos ETLF, ETL e ET. Foram realizados os mesmos procedimentos metodológicos de coleta, biometria, preservação das folhas e análise do teor foliar de ergosterol do Experimento 1.

3.5. Análise dos dados

Para todos os parâmetros biométricos das hastes de *S. alterniflora*, da análise visual das folhas lesionadas e da biomassa fúngica quantificados ao longo dos 2 experimentos foram realizados os testes de Normalidade Kolmogorov-Smirnov e de Homocedasticidade (Cochran C., Hartley e Bartlett), ambos a 5% de significância, como requisito para as análises estatísticas paramétricas (Zar, 2010). Os parâmetros medidos sofreram transformações matemáticas, quando necessário, para satisfazer os requisitos de homocedasticidade e normalidade. A variável formação de perfilhos do Experimento 2 foi transformada pela função $\log_{10}(x)$. Durante a preservação e o processamento das folhas para análise da quantificação do teor de ergosterol, duas amostras de cada experimento tiveram que ser descartadas, gerando matrizes de dados não balanceadas entre tratamentos.

3.5.1. Experimento 1

Diferenças no desenvolvimento das mudas (altura final, número de folhas vivas número de perfilhos e biomassa aérea seca) de *S. alterniflora* foram comparadas entre

níveis de herbivoria (HE) e da presença do fungicida (FU) através de ANOVAs bifatoriais (com fator de interação HE x FU), seguidas pelo teste de Tukey a 5% de significância (Zar, 2010). O teste do Qui-quadrado (χ^2) foi usado para analisar diferenças entre frequências de sobrevivência das hastes transplantadas entre os tratamentos. As médias de temperaturas dentro das gaiolas de exclusão e vazadas foram comparadas através do teste “t” de Student (com nível de significância 5%). Médias das biomassas de fungos e a percentagem de área foliar danificada foram comparadas entre tratamentos de gaiolas protegidas através de ANOVAs unidirecionais, seguida pelo Teste de Tukey, a 5% de significância (Zar, 2010). Os resultados das ANOVAs foram analisados quanto a significância estatística dos tratamentos, bem como pela percentagem da variabilidade total no experimento de cada parâmetro contabilizada por cada tratamento. A contabilização da variabilidade foi realizada do coeficiente eta quadrado, que foi calculado pela divisão da Soma dos Quadrados do tratamento “i” (SQ_i) pela Soma dos Quadrados total (SQT) da variável. O coeficiente eta quadrado foi expresso percentualmente como “%SQ_i” (Zar, 2010).

3.5.2. Experimento 2

Devido ao desenho amostral que objetivou comparar o efeito de lesões simuladas sobre pares de hastes marcadas de *S. alterniflora*, os parâmetros biométricos (crescimento vertical e formação foliar) foram comparados através de 2 procedimentos. A dependência das medições resultou de cada par de hastes pertencer a um mesmo propágulo (clone). Inicialmente, o efeito das lesões foi analisado pela comparação do desenvolvimento das hastes lesionadas e não lesionadas, em termos de crescimento vertical e formação foliar, através do teste não-paramétrico de Wilcoxon (Siegel, 1975) para amostras dependentes e pareadas. Esses testes foram avaliados considerando o nível de significância a 5%. No segundo procedimento, os efeitos dos tratamentos presença de fungicida (FU) e tipo de propágulo (TI) sobre o crescimento vertical e formação foliar foram avaliados pela comparação, separadamente para hastes lesionadas e para hastes não lesionadas, através de ANOVAs fatoriais incluindo a interação FU x TI. A formação de perfílios também foi avaliada através de uma ANOVA, considerando FU, TI e FU x TI. Com este procedimento, foi garantida a independência das amostras comparadas (hastes lesionadas ou hastes não

lesionadas), que pertenciam a diferentes gaiolas (propágulos).

A biomassa fúngica das folhas e a percentagem de área foliar danificada foram comparadas entre os tratamentos (ET, ETL, ETLF, ER, ERL e ERLF), separadamente para cada tipo de propágulo (muda recém-transplantada ou rebrote), através de ANOVAs.

Todas as ANOVAs foram avaliadas em um nível de significância de 5%, e quando necessário foram efetuados testes de comparações múltiplas de Tukey, a 5% de significância (Zar, 2010). O coeficiente eta quadrado de quantificação da variabilidade contabilizada por cada tratamento das ANOVAs foi estimado e expresso percentualmente como “%SQi” (Zar, 2010).

4. RESULTADOS

4.1. Dados abióticos e número de tocas m⁻²

4.1.1. Experimento 1

Ao longo da área experimental localizada na Ilha da Pólvora, a densidade de tocas de caranguejos apresentou uma média de $15,0 \pm 1,0$ tocas m⁻² (erro padrão; n = 60), com valores mínimo e máximo, respectivamente, 7 e 33 tocas m⁻². Durante os 21 dias de crescimento das mudas de *S. alterniflora*, a temperatura do ar oscilou entre 12 e 33 °C ($22,5 \pm 3,5$ °C; média \pm desvio padrão). As médias de temperatura dentro das gaiolas de exclusão ($26,0 \pm 0,7$ °C) e vazadas ($25,6 \pm 0,7$ °C) não apresentaram diferenças significativas ($t = -0,4$; $p > 0,05$; $n = 9$ para cada tipo de gaiola). A salinidade da água do estuário oscilou entre 14,5 e 31,1 ($22,6 \pm 6,0$) e a frequência de alagamento da área experimental foi aproximadamente de 65% do tempo. A salinidade do sedimento no plano entremarés só teve maiores variações dentro do plano no 1º dia de coleta (26,7 a 62,7 g sal kg solo⁻¹), tendo uma média de $24,6 \pm 11,7$ g sal kg solo⁻¹ ao longo do Experimento 1.

4.1.2. Experimento 2

Após 35 dias do outono de 2013, do Experimento 2, a temperatura do ar oscilou entre 10 °C e 24 °C ($20,2 \pm 1,9$ °C ; média \pm desvio padrão). A salinidade da água teve valores entre

18,0 e 30,0 ($21,2 \pm 6,2$), a frequência de alagamento foi em torno de 75% do tempo, com uma média de lâmina de alagamento de 5 cm (o nível da água -17 cm do nível médio da lagoa). A salinidade do sedimento teve um pico no 2º dia de coleta ($44,0 \text{ g sal kg solo}^{-1}$) e a sua média foi de $25,5 \pm 7,4 \text{ g sal kg solo}^{-1}$.

4.2. Respostas biométricas das plantas analisadas

4.2.1. Experimento 1

Após vinte e um dias do plantio, 100% das mudas de *S. alterniflora* protegidas com gaiolas de exclusão sobreviveram, enquanto nas gaiolas vazadas a sobrevivência foi cerca de 65% ($\chi^2 = 16,3$; $p < 0,01$). Os valores médios da altura final das mudas de *S. alterniflora* diferiram entre os níveis de herbivoria ($F = 17,0$; $p < 0,001$), no entanto, não ocorreram efeitos significativos de FU ($F = 0,4$; $p > 0,05$) e da interação FU x HE ($F = 0,1$; $p > 0,05$) (Tabela 6A). As médias globais de altura das plantas em gaiolas de exclusão e vazadas foram, respectivamente, 48,6 e 23,5 cm (Fig. 4A).

O número médio de folhas vivas das mudas de *S. alterniflora* possuíram diferenças somente entre os níveis de herbivoria (HE) ($F = 68,5$; $p < 0,001$), enquanto que no efeito FU ($F = 0,08$; $p > 0,05$) e interação IN x FU ($F = 0,39$; $p > 0,05$) não diferiram (Tabela 6A). As hastes em gaiolas de exclusão possuíam mais folhas (Teste de Tukey; $p < 0,05$; $3,5 \pm 0,2$ folhas por haste) do que as hastes em gaiolas vazadas ($0,6 \pm 0,3$ folhas por haste) (Fig 4B). Já o número de perfilhos também se diferenciou entre os níveis de herbivoria ($F = 94,4$; $p < 0,001$) e enquanto os outros efeitos analisados (FU: $F = 0,9$; $p > 0,05$ e FU x HE: $F = 0,3$; $p > 0,05$) não foram significativos (Tabela 6B). Os valores médios do número de perfilhos nas gaiolas de exclusão que tinham lesões em suas folhas (com ou sem fungicida) foram significativamente maiores ($p < 0,05$) que os tratamentos restantes, bem como as gaiolas protegidas sem folhas lesionadas (EX e EF) apresentaram resultados significativamente superiores ($p < 0,05$) do que as gaiolas vazadas (VA e VF) (Fig. 4C).

A biomassa aérea seca das mudas de *S. alterniflora* também apresentou diferenças apenas no efeito HE ($F = 13,5$; $p < 0,001$) (Tabela 6B). As biomassas médias dos tratamentos com gaiolas de exclusão (EX: $38,4 \pm 6,1 \text{ g m}^{-2}$; EF: $38,1 \pm 5,3 \text{ g m}^{-2}$; EL: $39,6$

$\pm 3,5 \text{ g m}^{-2}$; ELF: $39,2 \pm 4,4 \text{ g m}^{-2}$) não diferiram ($p > 0,05$) entre si e foram significativamente maiores do que das gaiolas vazadas (VA: $13,9 \pm 5,2 \text{ g m}^{-2}$; VF: $18,4 \pm 5,2 \text{ g m}^{-2}$) (Fig. 5).

A herbivoria contabilizou cerca de 70% da variabilidade do número de folhas vivas e de perfilhos de *S. alterniflora*, sendo as respostas em altura e biomassa aérea muito menos determinadas por este fator (33-38%) (Tabela 6 A,B).

Tabela 6: Análises de Variância das médias da altura final e do número de folhas vivas da haste principal (A), além do número de perfilhos e da biomassa aérea seca (g m^{-2}) (B) das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a diferentes intensidade de herbivoria e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados.

A)

Tratamento	Altura final				Número de folhas vivas		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
FU	1	0,5	0,4	NS	0,1	0,1	NS
HE	2	38,3	17,0	***	71,4	68,5	***
FU x HE	2	0,4	0,2	NS	0,4	0,4	NS
Resíduo	54	60,8			28,1		

*** $p < 0,001$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

B)

Tratamento	Número de perfislos				Biomassa aérea seca		
	gl	%SQ	F	Sig	%SQ	F	Sig
FU	1	0,4	0,9	NS	0,1	0,1	NS
HE	2	77,2	94,4	***	33,1	13,5	***
FU x HE	2	0,3	0,3	NS	0,4	0,2	NS
Resíduo	54	22,1			66,4		

*** $p < 0,001$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

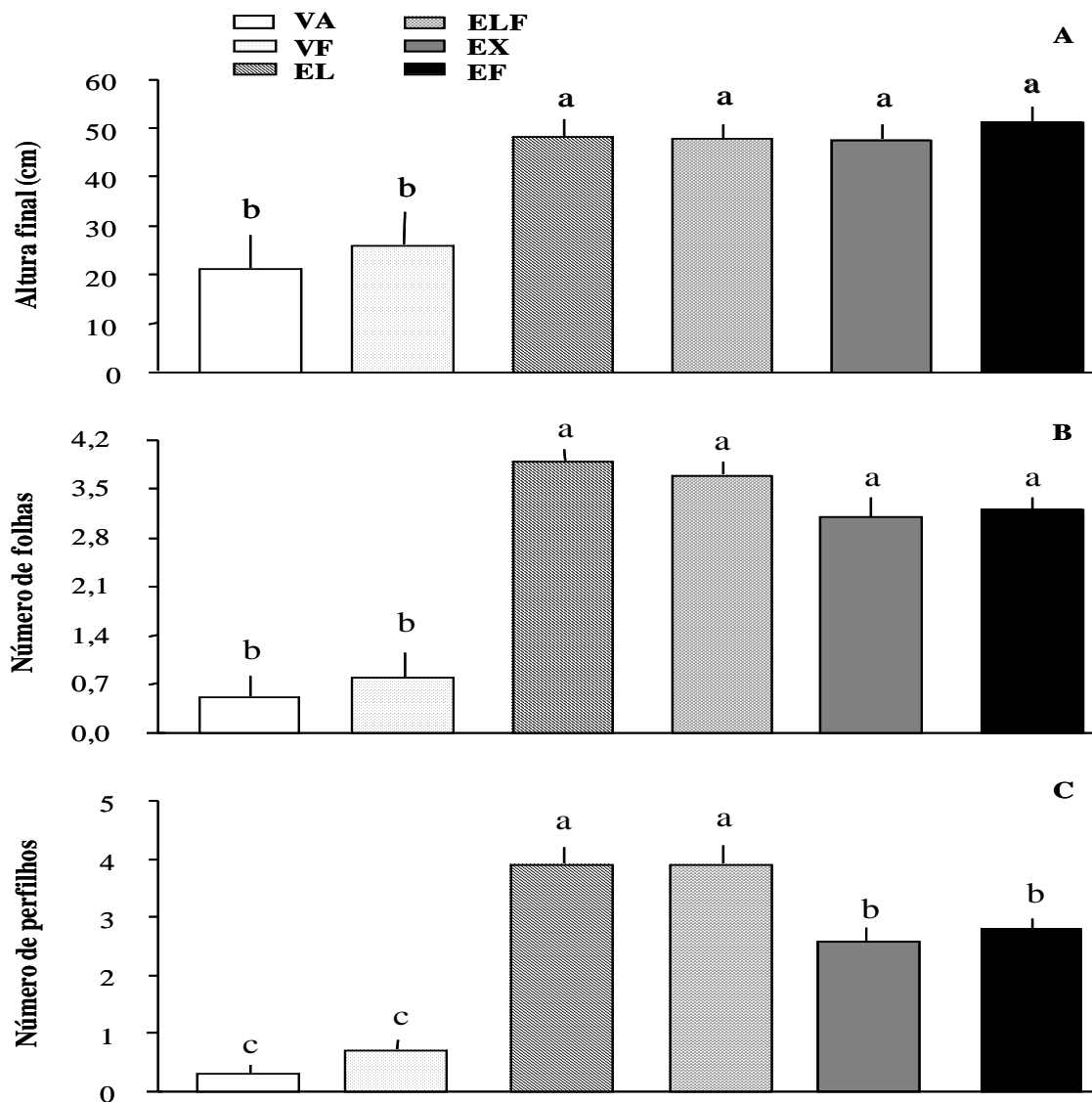


Figura 4: Valores médios (\pm erro padrão) da altura (cm; A) e número de folhas vivas (B) da haste principal, e de perfilhos das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a diferentes intensidade de herbivoria e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).

Tratamentos: protegidas com lesões simuladas e com fungicida (ELF); protegidas com lesões simuladas e sem fungicida (EL); protegidas sem lesões e com fungicida (EF); protegidas sem lesões e sem fungicida (EX); gaiolas vazadas com fungicida (VF); gaiolas vazadas sem fungicida (VA).

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

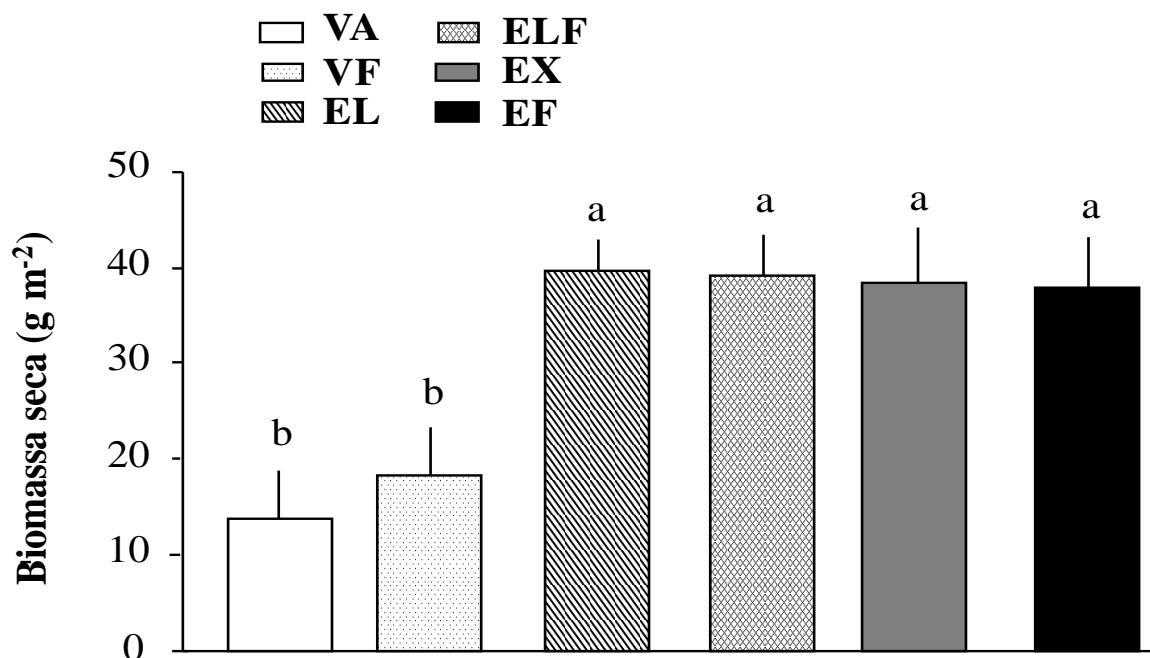


Figura 5: Valores médios (\pm erro padrão) da biomassa aérea seca (g m^{-2}) das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a diferentes intensidades de herbivoria e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).

Tratamentos: protegidas com lesões simuladas e com fungicida (ELF); protegidas com lesões simuladas e sem fungicida (EL); protegidas sem lesões e com fungicida (EF); protegidas sem lesões e sem fungicida (EX); gaiolas vazadas com fungicida (VF); gaiolas vazadas sem fungicida (VA).

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.2.2. Experimento 2

A avaliação das hastes pareadas demonstrou que a simulação de lesão foliar acarretou em um efeito significativo (teste de Wilcoxon; $T = 5,0$; $p < 0,05$) apenas no crescimento vertical em hastes transplantadas que foram pulverizadas com fungicida (Fig. 6A,B). As hastes das folhas não lesionadas desse tratamento apresentaram um crescimento vertical ($20,4 \pm 2,2 \text{ cm } 35 \text{ dias}^{-1}$), que foi 34% maior do que as lesionadas ($15,2 \pm 1,3 \text{ cm } 35 \text{ dias}^{-1}$). Em todos os tratamentos analisados, a formação foliar não apresentou diferenças entre folhas lesionadas e não lesionadas (Tabela 7).

O crescimento vertical das hastes marcadas diferiu apenas entre os tipos de

propágulos (TI), tanto nas hastes das folhas lesionadas ($F_{TIL} = 12,1$; $p < 0,01$) quanto nas não lesionadas ($F_{TIN} = 7,9$; $p < 0,01$). Os efeitos FU ($F_{FUL} = 0,5$; $p > 0,05$ e $F_{FUN} = 0,1$; $p > 0,05$) e a interação FU x TI ($F_{FUL \times TIL} = 0,3$; $p > 0,05$ e $F_{FUN \times TIN} = 3,5$; $p > 0,05$) não apresentaram significância. O TI e o resíduo registrou respectivamente, em torno de 20% e 75%, da variabilidade do crescimento vertical de ambos pares de hastes marcadas (com e sem lesão foliar).

A formação foliar das hastes marcadas não foi significativamente diferente dos efeitos analisados: TI ($F_{TIL} = 0,03$; $p > 0,05$ e $F_{TIN} = 0,0$; $p > 0,05$), FU ($F_{FUL} = 0,03$; $p > 0,05$ e $F_{FUN} = 0,21$; $p > 0,05$) e FU x TI ($F_{FUL \times TIL} = 0,31$; $p > 0,05$ e $F_{FUN \times TIN} = 1,9$; $p > 0,05$). O resíduo atingiu aproximadamente 95% da variabilidade da formação foliar das hastes marcadas lesionadas e não lesionadas.

A formação de perfílios foi fortemente determinada por TI ($F_{TI} = 16,9$; $p < 0,001$), que contabilizou 30% da variabilidade desta variável. As gaiolas de rebrotes ($20,5 \pm 2,8$ perfílios 35 dias⁻¹) e de transplantes ($6,8 \pm 1,1$ perfílios 35 dias⁻¹) com fungicida apresentaram menores valores em formação de perfílios do que dos respectivos propágulos sem fungicida (rebrote = $22,2 \pm 3,5$ perfílios 35 dias⁻¹; transplante = $7,6 \pm 0,8$ perfílios 35 dias⁻¹). Entretanto, o tratamento FU ($F_{FU} = 0,1$; $p > 0,05$) e FU x TI ($F_{FU \times TI} = 0,02$; $P > 0,05$) não foram significativos.

Tabela 7: Comparação das taxas de crescimento vertical (cm) e de formação foliar entre hastes pareadas com e sem lesão foliar através do Teste de Wilcoxon. Hastes pertenciam a uma mesma planta e as taxas foram calculadas após 35 dias de exposição a lesões simuladas de caranguejos e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).

Hastes pareadas e dependentes	Crescimento vertical com e sem lesão			Formação foliar com e sem lesão	
	Tratamento	n	T	Sig	T
Com fungicida e rebrote	10	20,0	NS	3,0	NS
Sem fungicida e rebrote	10	14,5	NS	8,0	NS
Com fungicida e transplante	10	5,0	*	3,0	NS
Sem fungicida e transplante	10	24	NS	2,0	NS

* $p < 0,05$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

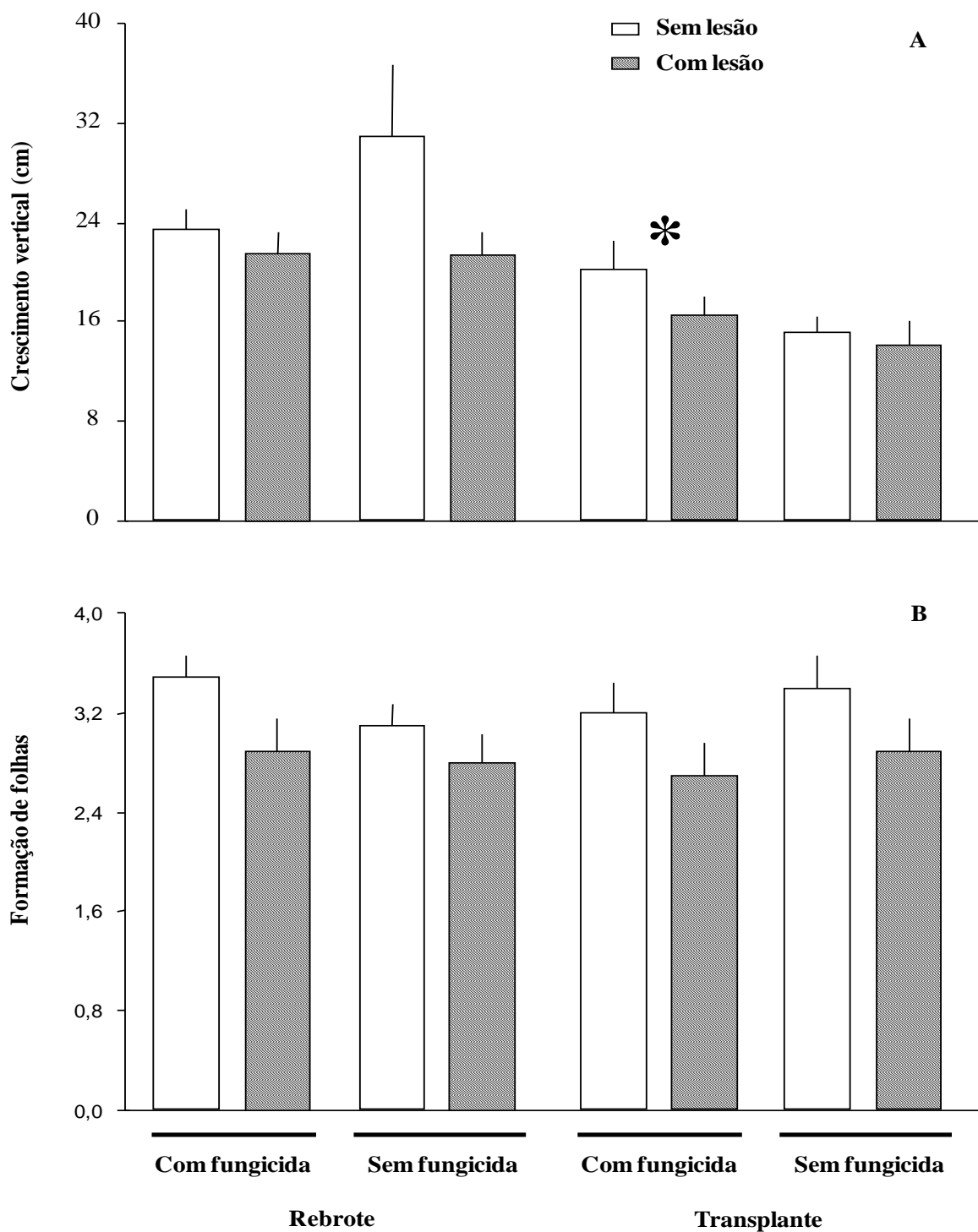


Figura 6: Valores médios (\pm erro padrão) do crescimento vertical (cm) e formação de folhas de mudas recém-transplantadas e rebrotes de *S. alterniflora* após 35 dias de

exposição a lesões simuladas de caranguejos e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).

* = diferenças significativas; conforme o Teste de Wilcoxon ($p < 0,05$) entre hastes lesionadas e não lesionadas. Tratamentos: rebrotes com lesões com fungicida (ERLF); rebrotes com lesões sem fungicida (ERL); rebrotes sem lesões com fungicida (ERF); rebrotes sem lesões sem fungicida (ER); mudas transplantadas com lesões com fungicida (ETLF); mudas transplantadas com lesões sem fungicida (ETL); mudas transplantadas sem lesões com fungicida (ETF); mudas transplantadas sem lesões sem fungicida (ET).

4.3. Biomassa fúngica e o índice de senescência das folhas

4.3.1. Experimento 1

Ao final do Experimento 1, a biomassa de fungos nas folhas de *S. alterniflora* apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de gaiolas de exclusão ($F = 5,4$; $p < 0,01$) (Tabela 8). Folhas que não sofreram nenhum tipo de lesão (EX: $0,40 \pm 0,13 \mu\text{g erg g}^{-1}$; média \pm erro padrão) possuíam biomassa de fungos significativamente menores ($p < 0,05$; teste de Tukey) do que as folhas lesionadas sem fungicida (EL: $1,01 \pm 0,20 \mu\text{g erg g}^{-1}$). Apesar do menor teor de ergosterol das folhas não lesionadas com fungicida (ELF; $0,63 \pm 0,05 \mu\text{g erg g}^{-1}$) em relação às lesionadas sem fungicida (EL), estes dois tratamentos não foram estatisticamente diferentes ($p > 0,05$) (Fig. 7A). A grande variabilidade do ergosterol entre as amostras resultou em uma predominância na variabilidade do resíduo na ANOVA (74% da variação total do ergosterol) (Tabela 8).

Os valores médios da a percentagem de área foliar danificada da *S. alterniflora* diferiram entre os tratamentos ($F = 20,6$; $p < 0,001$) (Tabela 8). Os danos nas folhas EL ($45,0 \pm 3,6\%$) foram significativamente maiores que de ELF ($30,0 \pm 3,0\%$) e EX ($12,0 \pm 4,2\%$). Este último tratamento também apresentou diferença ($p < 0,05$) com os valores médios do ELF (Fig. 7B). O lesionamento foliar e a aplicação de fungicida explicaram conjuntamente 57% da variabilidade do dano foliar.

Tabela 8: Análises de Variância das médias da biomassa fúngica das folhas ($\mu\text{g erg g}^{-1}$; peso fresco) e da percentagem de área foliar danificada das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a diferentes intensidade de herbivoria e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados.

Tratamento	Biomassa fúngica				Área foliar danificada		
	gl	%SQ	F	p	%SQ	F	p
Fatores	2	25,9	5,4	**	57,1	20,6	***
Resíduo	31	74,1			42,9		

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; NS: não significativo ($p > 0,05$).

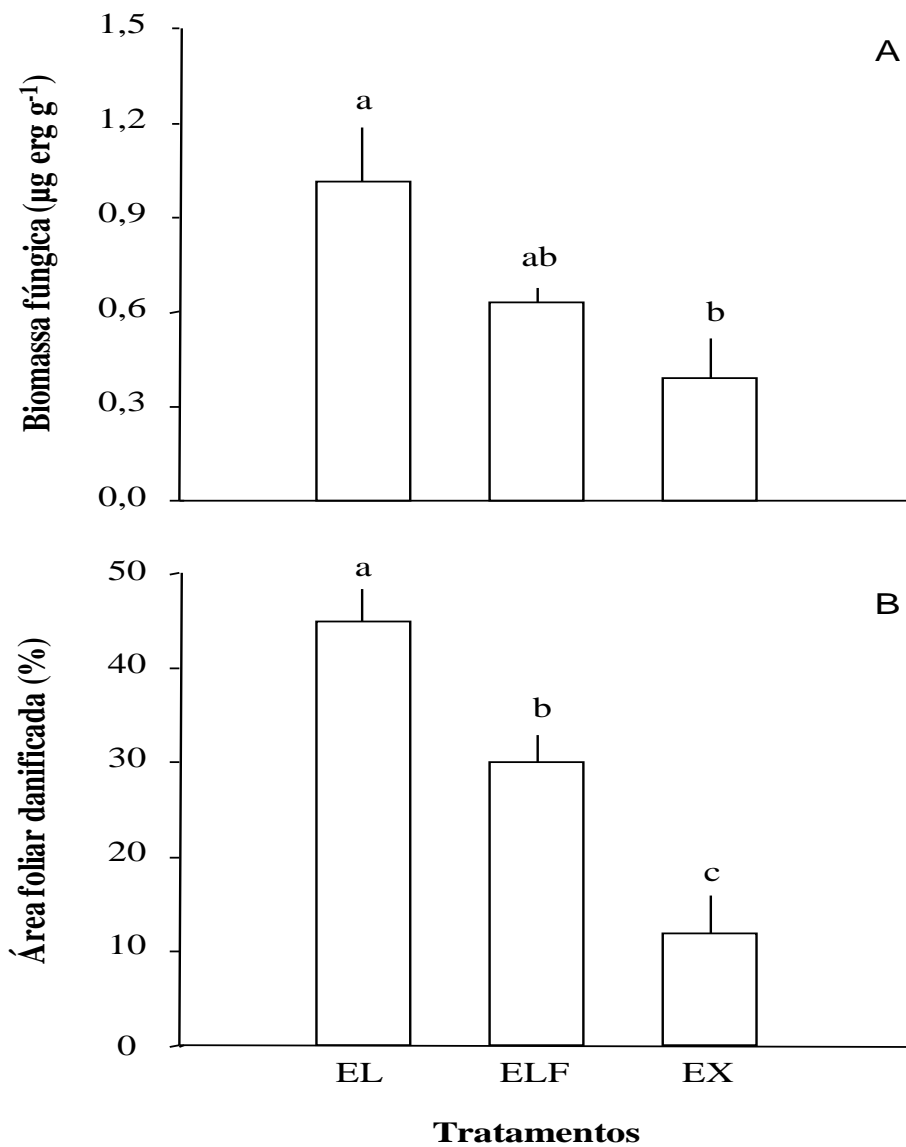


Figura 7: Valores médios e erro padrão (\pm) da biomassa fúngica das folhas ($\mu\text{g erg g}^{-1}$; peso fresco) (A) e da percentagem de área foliar danificada (B) das mudas de *S. alterniflora* após 21 dias de exposição a lesões simuladas de caranguejos e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).

Tratamentos em gaiolas protegidas: com lesões simuladas e com fungicida (ELF); com lesões simuladas e sem fungicida (EL); sem lesões e sem fungicida (EX).

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

4.3.2. Experimento 2

Após 35 dias, a biomassa fúngica das folhas de *S. alterniflora* apresentaram diferenças entre os tratamentos dos 2 tipos de propágulos (Rebrote: F = 7,3; p < 0,001; Transplante: F = 9,3; p < 0,01) (Tabela 9A,B). Os valores médios da biomassa de fungos das amostras foliares lesionadas das hastes de transplantes (ETL) foram significativamente maiores (p < 0,05) do que a das folhas ETLF e ET. Em hastes de rebrotas, as folhas lesionadas também tiveram resultados médios significativamente superiores às que com lesões e que foram pulverizadas com fungicida (ERLF) e das amostras foliares do controle (ER). (Fig. 8A).

A percentagem de área foliar danificada diferiu entre os tratamentos (Rebrote: F = 6,9; p < 0,001; Transplante: F = 12,0; p < 0,001) (Tabela 9A,B). Os valores médios de danos nas folhas ETL foram significativamente maiores (p < 0,05, teste de Tukey) do que o ET. Assim como hastes de transplantes, as folhas de hastes de rebrote ERL foram significativamente mais danificadas do que o ER. A percentagem de área foliar danificada foi maior em transplantes que em rebrotadas, entretanto a aplicação de fungicida não influenciou o dano foliar (Fig. 8B).

Tabela 9: Análises de Variância das médias da biomassa fúngica das folhas ($\mu\text{g erg g}^{-1}$; peso fresco) e da percentagem de área foliar danificada da *S. alterniflora* após 35 dias de exposição a lesões simuladas de caranguejos e aplicação de fungicida em um plano entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS). Os graus de liberdade (gl) e as percentagens da Soma dos Quadrados (%SQ) contabilizadas por cada tratamento (coeficiente eta quadrado de explicação da variabilidade experimental) são apresentados. A - Folhas de hastes rebrote; B - folhas de hastes recém-transplantadas. Tratamento

A)

Tratamento	Biomassa fúngica				Área foliar danificada		
	gl	%SQ	F	p	%SQ	F	p
Fatores	2	51,3	7,3	**	49,8	6,9	**
Resíduo	14	48,7			50,2		

** p < 0,01; NS: não significativo (p > 0,05).

B)

Tratamento	Biomassa fúngica				Área foliar danificada		
	gl	%SQ	F	p	%SQ	F	p
Fatores	2	57,0	9,3	**	63,1	12,0	***
Resíduo	14	43,0			36,9		

** p < 0,01; *** p < 0,001; NS: não significativo (p > 0,05).

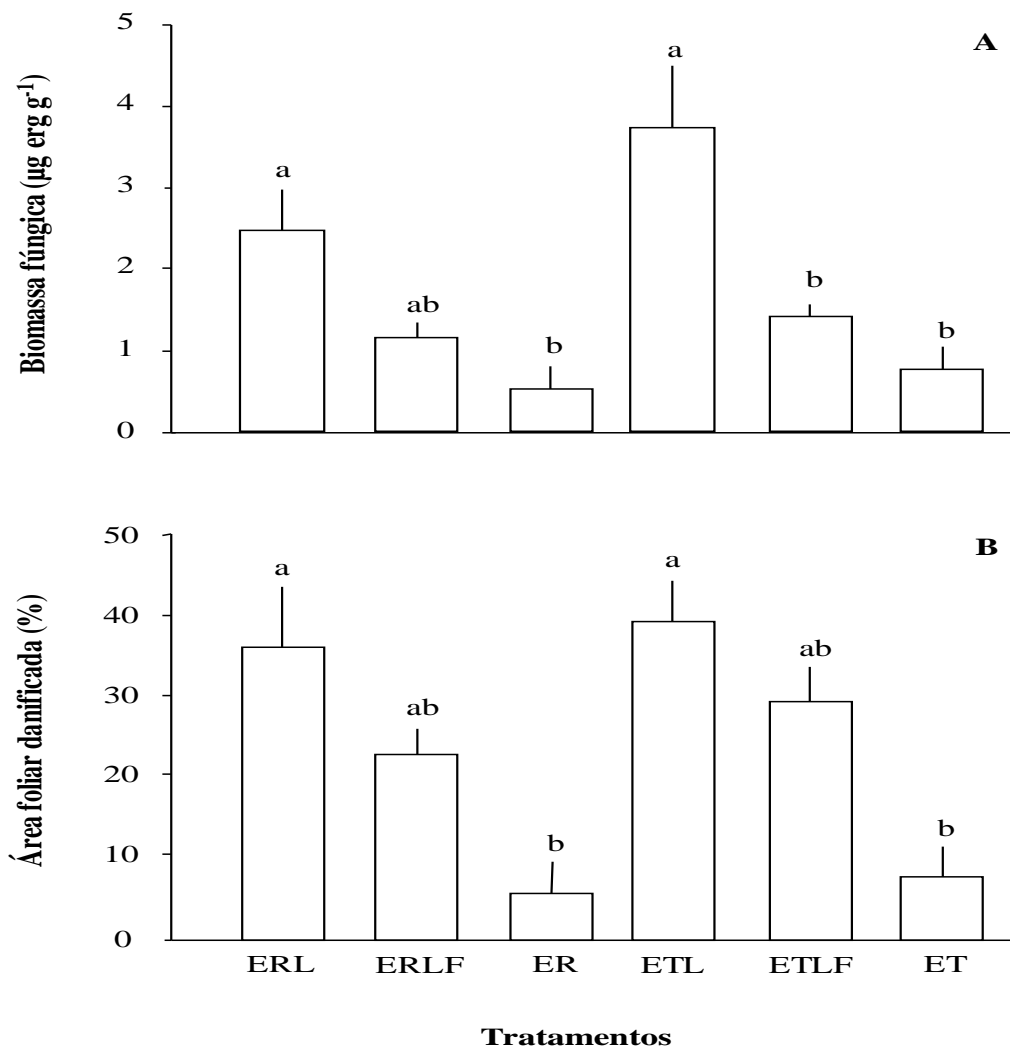


Figura 8: Valores médios e erro padrão (\pm) da biomassa fúngica das folhas ($\mu\text{g erg g}^{-1}$; peso fresco) e da área foliar senescente (%) das mudas de *S. alterniflora* após 35 dias de exposição a lesões simuladas de caranguejos e aplicação de fungicida em um plano

entremarés da Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).

Tratamentos: rebrotes com lesões com fungicida (ERLF); rebrotes com lesões sem fungicida (ERL); rebrotes sem lesões sem fungicida (ER); mudas transplantadas com lesões com fungicida (ETLF); mudas transplantadas com lesões sem fungicida (ETL); mudas transplantadas sem lesões sem fungicida (ET).

Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Mortalidade e crescimento de mudas de *S. alterniflora* em diferentes intensidades de herbivoria

O uso das gaiolas de exclusão demonstrou ser eficiente contra o intenso pastoreio de caranguejos *N. granulata* (média do número de tocas $m^{-2} \approx 15,0 \pm 1,0$), tanto que nenhuma muda de *S. alterniflora* protegida morreu ao longo do experimento. Já as plantas que estavam em gaiolas vazadas tiveram uma sobrevivência de aproximadamente 65% após 21 dias. Estudos realizados anteriormente, durante o período de verão e outono, encontraram densidades médias de tocas de *N. granulata* nos planos entremarés da Ilha da Pólvora entre 10 e 34 tocas m^{-2} (Rosa & Bemvenuti, 2004; Alberti et al., 2007; Silva, 2014). Marangoni & Costa (2012) observaram que após 30 dias de transplante de mudas de *S. alterniflora* em um plano de lama da Ilha da Pólvora, 25% das mudas morreram devido a pastagem por *N. granulata*. A densidade de tocas e o impacto da herbivoria por *N. granulata* observados no Experimento 1 foram compatíveis com situações já observadas desse organismo. D’Incao et al. (1992) relatam densidades desses herbívoros de até 98 ind m^{-2} em outras partes do estuário da Lagoa dos Patos. O pastoreio de *N. granulata* sobre *S. alterniflora* afeta o desenvolvimento e a sobrevivência das suas hastes (Costa et al., 2003). Alberti et al. (2007) também demonstraram que os efeitos negativos no crescimento de plantas desse gênero são mais acentuados nas margens de planos entremarés de marismas ou nas regiões onde não têm a presença de várias plantas ao seu redor (como ocorreu no presente experimento).

Assim como em nossos experimentos, Daleo et al. (2009) demonstraram que a pastagem por *N. granulata* reduz a altura da *S. alterniflora* (média redução $\approx 25\%$ após 16

meses). Alberti et al (2007) observou uma redução da altura das hastes de *S. alterniflora* pastadas por *N. granulata* de 45% em relação a hastes não pastadas após um ano e meio de experimentação. Anteriormente, Costa et al. (2003) observaram uma redução significativa das hastes de *S. alterniflora* com o aumento da intensidade de pastagem por *N. granulata*. Silliman & Zieman (2001) constataram que o pastoreio do caramujo *L. irrorata*, em gaiolas de inclusão com alta densidade (144 ind. m⁻²), acarretou igualmente em redução de cerca de 20% da altura das plantas de *S. alterniflora* após 4 meses.

O número de folhas vivas de *S. alterniflora* nas gaiolas vazadas foi reduzido a 1/6 do valor médio de folhas das gaiolas de exclusão pelo ataque dos caranguejos *N. granulata*. Insetos sugadores de seiva, como o *Prokelisia marginata*, também reduzem significativamente o número de folhas vivas da *S. alterniflora* (Moon & Stiling, 2002). A preservação das folhas pelo uso de gaiolas de proteção permitiu que mudas de *S. alterniflora* apresentassem um perfilhamento 440% maior do que as mudas de gaiolas vazadas. Este perfilhamento, por sua vez, é um dos principais determinantes da biomassa aérea de *S. alterniflora* (Daleo et al., 2009), conseqüentemente *N. granulata* exerce forte controle sobre a produtividade da *S. alterniflora*. O valor médio de biomassa aérea seca (g m⁻²) de *S. alterniflora* do EL foi 160% maior do que as mudas das 2 gaiolas vazadas (VA e VF). Silliman & Newell (2003) encontraram biomassas de *S. alterniflora* em gaiolas protegidas aproximadamente 100% maiores do que aquelas desprotegidas dos herbívoros.

Contrastando com a marcada redução de crescimento das gaiolas vazadas, sob baixa intensidade de herbivoria (*e.g.*, lesões simuladas nas folhas; EL e ELF) *S. alterniflora* teve a produção de novas hastes estimuladas, apresentando um maior número de perfilhos do que os tratamentos restantes. As plantas de *S. alterniflora* são conhecidas por tolerar cortes/pastagem de suas folhas, e em alguns casos, esses danos nas plantas como uma medida controle, podem até impulsionar a produção de novos perfílhos (Aberle, 1990). Já foi descrito por Verkaar (1988) que a pastagem por herbívoros pode alterar a fisiologia da planta em modos que pode melhorar ou reduzir a habilidade da planta em crescer/rebrotar após ter sofrido herbivoria. Alguns herbívoros inclusive podem promover o desenvolvimento da planta através de um consumo moderado (*e.g.*, compensação; Hawkes & Sullivan, 2001; Yamauchi & Yamaura, 2004). O mecanismo de como lesões parciais de

um pequeno número de folhas pode estimular o perfilhamento de *S. alterniflora* deve ser melhor estudado. Esta pode ser uma ferramenta de manejo muito importante de novos transplantes, para a tomada de decisão da instalação ou não exclusões de caranguejos, visto que talvez em baixa abundância a manutenção dos caranguejos possa ser recomendada para estimulação do perfilhamento.

Os resultados do Experimento 2 demonstraram que a resposta a herbivoria das plantas de *S. alterniflora* é grandemente dependente do tamanho do propágulo exposto ao herbívoro. Por exemplo, o número de folhas por hastes de rebrote e de hastes de transplante recente não lesionadas com fungicida foram, respectivamente, cerca de 20% e 6% maiores do que das hastes que sofreram lesão. Hastes de propágulos já estabelecidos (rebrotos) tiveram valores médios de altura em torno de 24% mais altos do que hastes recém-transplantadas. Outros autores (Bertness, 1991; Alberti et al., 2007; Mendonça & Costa, 2008; Marangoni & Costa, 2012) apontaram que as mudas pequenas e recém- estabelecidas são mais vulneráveis a estresses ambientais (*e.g.*, alta salinidade, anoxia e herbivoria) do que propágulos maiores e/ou densamente enraizados. Desta maneira, a vulnerabilidade das mudas de *S. alterniflora* ao pastoreio de *N. granulata* reduz marcadamente com o tamanho. Consequentemente, um maior sucesso na ocupação espacial por mudas de *S. alterniflora* transplantadas em áreas densamente habitadas por esse caranguejo poderia ser alcançado através de mudas maiores (tufos com 10 ou mais hastes) ou exclusão de caranguejos nos 2 primeiros meses de estabelecimento.

5.2. Facilitação da infecção de fungos por caranguejos e o uso do ergosterol como medida de biomassa de fungos

As análises nas folhas de *S. alterniflora* confirmaram que as lesões simuladas do caranguejo *N. granulata* facilitaram na invasão fúngica, corroborando com os resultados encontrados por Silliman & Newell (2003; lesões de *L. irrorata*) e Daleo et al. (2009; lesões de *N. granulata*). Diferentemente dos trabalhos citados acima, foi possível avaliar que, sob lesionamento parcial de algumas folhas, esses microorganismos não afetaram os parâmetros biométricos de mudas da *S. alterniflora* em processo de estabelecimento sobre

um plano entremarés nos 2 experimentos executados na Ilha da Pólvora.

As simulações de lesões nas folhas têm demonstrado que o simples mecanismo de abertura do tecido vegetal é uma engenharia ampla em promover invasão e crescimento de fungos em folhas de *S. alterniflora*, uma vez que os esporos são onipresentes em toda superfície da marisma (Newell, 2001a; Silveira, 2012). É importante salientar que em um trabalho realizado com diversidade de fungos por Silveira (2012), foi encontrado que os gêneros *Fusarium sp.* e *Rhizoctonia sp.* são os mais frequentes em folhas de *S. alterniflora* na Ilha da Pólvora durante o período de verão-outono. Os fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* podem provocar manchas foliares e estão associados à decomposição das hastes de *S. alterniflora*, no entanto, não existem provas de que esses microorganismos por si só possam causar a mortalidade de plantas dessa espécie (Elmer et al., 2011). Além disso, LaMondia & Martin (1989) demonstraram que uma interação das lesões de nematóides com fungos do gênero *Rhizoctonia* pode aumentar a severidade da decomposição das hastes de morangos. Consequentemente, existem poucas evidências que estes fungos mais frequentes possam ser patógenos, bem como que a pulverização com Daconil e a inibição dos fungos possa levar a um benefício para o crescimento das mudas de *S. alterniflora*.

A infecção foliar de fungos em mudas de *S. alterniflora* mostrou ser dependente da sensibilidade da muda a ação do herbívoro, que foi associada ao tamanho do propágulo. A adição do fungicida Daconil limitou o crescimento de fungos principalmente nas folhas com lesões das hastes recém-transplantadas do Experimento 2. Folhas de hastes transplantadas lesionadas (ETL) tiveram biomassa fúngica 50% superiores das hastes de rebrotes lesionadas (ERL). Adicionalmente, a biomassa fúngica das folhas lesionadas (ETL) foi cerca de 160% maior do que aquelas com dano e presença de fungicida (ETLF). O estresse que as plantas transplantadas sofrem para se adaptar a zona entremarés pode ter facilitado a infecção fúngica em suas lesões foliares e uma maior biomassa de fungos do que nas plantas já estabelecidas no ambiente (rebrote). Esse fato pode ser relacionado com a percentagem de dano foliar, pois as folhas que apresentaram maiores valores médios desse parâmetro também exibiram os mais altos teores de ergosterol. Sieg et al. (2013) encontraram os valores mais altos de ergosterol ($30,7 \pm 7,1 \mu\text{g erg g}^{-1}$; peso seco) nos tecidos foliares que estavam bem danificados pelo ataque dos caramujos *L. irrorata* (≈ 10

cm cada folha) de *S. alterniflora* coletadas em uma marisma da Geórgia (EUA). Adicionalmente, Silliman & Newell (2003) identificaram que a própria deposição de “pellets fecais” nas folhas de *S. alterniflora* por esses caramujos também facilita uma maior infecção fúngica.

Cabe destacar que, o aumento de 21 para 35 dias de período experimental na Ilha da Pólvora, do Experimento 1 para o Experimento 2, pode ter ocasionado em maiores valores de biomassa de fungos nas folhas de *S. alterniflora*. As durações dos experimentos foram limitadas devido ao risco de diversas folhas lesionadas/senescentes serem levadas pela alta frequência de alagamento ($\approx 70\%$) do plano de lama. A produção de ergosterol pode estar relacionada às características específicas das espécies de fungos, ou em uma mesma espécie de fungo durante as diferentes fases do ciclo de vida (Newell, 1992; Gessner & Chauvet, 1993). Somado a isso, uma grande diversidade de outros fatores, como a taxa de crescimento, temperatura, oxigênio e disponibilidade de nutrientes, afetam a produção do ergosterol (Newell, 1992; Gessner & Chauvet, 1993; Medeiros et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

O *N. granulata* atua como um importante organismo regulador na sobrevivência, crescimento e perfilhamento de mudas de *S. alterniflora* transplantadas em planos entremarés do sul do Brasil. Ao longo do trabalho, foi demonstrado que as lesões simuladas do caranguejo *N. granulata* estimulam a infecção de fungos nas folhas da planta. A infecção fúngica acelera a degeneração foliar, mas causa poucos efeitos no desenvolvimento das plantas.

É possível afirmar que há um maior impacto de herbívoros e fungos nas plantas recém-estabelecidas nas marismas. Estudos detalhados de caracterização de espécies de fungos patogênicas e saprófitas em plantas de *Spartina*, bem como sobre a resistência destas espécies de fungos a fungicidas e os efeitos tóxicos destes pesticidas aos caranguejos necessitam ser desenvolvidos. Informações sobre o tempo médio de absorção de pesticidas nas plantas e métodos alternativos para o controle da herbivoria por caranguejos são necessários para um maior sucesso dos transplantes de plantas de marismas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aberle, B., 1990. The Biology, Control, and Eradication of Introduced *Spartina* (cordgrass) worldwide and recommendations for its control in Washington. Draft, WA Department of Natural Resources report.
- Adam, P., 1993. Saltmarsh ecology. Cambridge University Press, Cambridge.
- Alberti, J., Escapa, M., Daleo, P., Iribarne, O., Silliman, B., Bertness, M., 2007. Large-scale herbivory patterns and grazing effects of the burrowing crabs in Southwestern Atlantic salt marshes. *Marine Ecology Progress Series* 349, 235-243.
- Anderson, P., Davidson, C.M., Littlejohn, D., Ure, A.M., Shand, C.A., Cheshire, M.V., 1994. Extraction of ergosterol from peaty soils and determination by high performance liquid chromatography. *Talanta* 41, 711-720.
- Bertness, M.D. 1991. Interspecific interactions among high marsh perennials in a New England salt marsh. *Ecology* 72, 125-137.
- Bortolus, A., Iribarne, O.O., 1999. The effect of the southwestern Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulata* on a *Spartina* salt-marsh. *Marine Ecology Progress Series* 178, 79-88.
- Castillo, J.M., Rubio-Casal, A.E., Redondo, S., Alvarez-Lopez, A.A., Luque, T., Luque, C., Nieva, F.J., Castellanos, E.M., Figueroa, M.E., 2005. Short-term responses to salinity of an invasive cordgrass. *Biological Invasions*, 7, 29-35.
- Chung, C.H., 2006. Forty years of ecological engineering with *Spartina* plantations in China. *Ecol. Engineering*. 27, 49-57.
- Costa, C.S.B., 2011. Restoration of Coastal Salt marshes in Brazil using Native Salt Marsh Plants. In: Sigurdur Greipsson. (Ed.), *Restoration Ecology*. Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, pp. 333-338.
- Costa, C.S.B., Marangoni, J.C., 1997. Criação de Marismas Com Espécies Nativas: Experimento Piloto No Sul do Brasil. In: *Anais do VII Congresso Latino Americano de Ciências do Mar*, Santos, pp. 200-201.
- Costa, C.S.B., Seeliger, U., Kinas, P.G., 1988. The effect of wind velocity and direction on the salinity regime in the lower Patos Lagoon estuary. *Ciência e Cultura (SBPC)* 40,

909-912.

- Costa, C.S.B., Marangoni, J.C., Azevedo, A.M.G., 2003. Plant zonation in irregularly flooded salt marshes: relative importance of stress tolerance and biological interactions. *Journal of Ecology* 91, 951-965.
- Costa, C.S.B., Iribarne, O.O., Farina, J.M., 2009. Human impacts and threats to the conservation of South American salt marshes. In: Silliman, B.R., Grosholtz, T., Bertness, M.D. (Eds.), *Salt Marshes under Global Siege*. University of California Press, Berkley, pp. 337-359.
- Daleo, P., Silliman, B.R., Alberti, J., Escapa, M., Canepuccia, A., 2009. Grazer facilitation of fungal infection and the control of plant growth in south-western Atlantic salt marshes. *Journal of Ecology* 97, 781-787.
- D'Incao, F., Ruffino, M.L., Silva, K.G., Braga, A.C., 1992. Responses of *Chasmagnathus granulata* Dana (Decapoda: Grapsidae) to salt-marsh environmental variations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 161, 179-188.
- Elmer, W.H., LaMondia, J.A., Caruso, F.L., 2011. Association between *Fusarium spp.* on *Spartina alterniflora* and dieback sites in Connecticut and Massachusetts. *Estuaries and Coasts* 35, 436-444.
- García-Guzmán, G., Dirzo, R., 2001. Patterns of leaf-pathogen infection in the understory of a Mexican rain forest: incidence, spatiotemporal variation, and mechanisms of infection. *American Journal of Botany* 88, 634-635.
- Gessner, M.O., Chauvet, E., 1993. Ergosterol-to-biomass conversion factors for aquatic hyphomycetes. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 502-507.
- Hawkes, C.V., Sullivan, J.J., 2001. The impact of herbivory on plants in different resource conditions: a meta-analysis. *Ecology* 82, 2045-2058.
- Ihara, 2014. Bula do fungicida Daconil-BR (IHARA - Agricultura é a nossa vida), <http://www.ihara.com.br/upload/produtos/bula/1349202613.pdf> (7 April 2014).
- Iribarne, O., Martinetto, P., Schwindt, E., Botto, F., Bortolus, A., Garcia Borboroglu, P., 2003. Evidences of habitat displacement between two common soft-bottom SW Atlantic intertidal crabs. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 296, 167-182.

- Iribarne, O., Bruschetti, M., Escapa, M., Bava, J., Botto, F., Gutierrez, J., Palomo, G., 2005. Small- and large-scale effect of the SW Atlantic burrowing crab *Chasmagnathus granulatus* on habitat use by migratory shorebirds. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 315, 87-101.
- LaMondia, J.A., Martin, S.B., 1989. The influence of *Pratylenchus penetrans* and temperature on root rot of strawberries by binucleate *Rhizoctonia spp.* *Plant Disease* 73, 107-110.
- Lubchenco, J., 1983. *Littorina* and *Fucus*: effects of herbivores, substratum, heterogeneity, and plant escapes during succession. *Ecology* 64, 1116-1123.
- Marangoni, J.C., Costa, C.S.B., 2012. Short- and long-term vegetative propagation of two *Spartina* species on a salt marsh in southern Brazil. *Estuaries and Coasts* 35, 763-773.
- Mata M., Moller, O.M., 1993. Sobre o Tempo de Descarga do estuário da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. *Atlântica* 15, 37-48.
- Medeiros, A.O., Pascoal, C., Graça, M.A.S., 2009. Diversity and activity of aquatic fungi under low oxygen conditions. *Freshwater Biology* 54, 142-149.
- Mendonça, P.T., Costa, C.S.B., 2008. Efeitos da disponibilidade de nitrogênio e fósforo no estabelecimento de *Spartina alterniflora* em um plano entremarés irregularmente alagado. *Neotropical Biology and Conservation* 3, 135-148.
- Möller, O.O., Castello, J.P., Vaz, A.C., 2009. The effect of river discharge and winds on the interannual variability of the pink shrimp *Farfantepenaeus paulensis* production in Patos Lagoon. *Estuaries and Coasts* 32, 787-796.
- Moon, D.C., Stiling, P., 2002. The Effects of herbivore feeding mode on top-down effects in a salt marsh ecosystem. *Oecologia* 133, 243-253.
- Newell, S.Y., 1992. Estimating fungal biomass and productivity in decomposing litter. In: Carroll, G.C., Wicklow, D.T. (Eds.), *The Fungal Community*. Marcel-Dekker, New York, pp. 521-561.
- Newell, S.Y., 1995. Minimizing ergosterol loss during preanalytical handling and shipping of samples of plant litter. *Applied and Environmental Microbiology* 61, 2794-2797.
- Newell, S.Y., 2001a. Multiyear patterns of fungal biomass dynamics and productivity within naturally decaying smooth cordgrass shoots. *Limnology and Oceanography*

46, 573-583.

- Newell, S.Y., Arsuffi, T.L., Fallon, R.D., 1988. Fundamental procedures for determining ergosterol content of Decaying Plant Material by Liquid Chromatography. *Applied and Environmental Microbiology* 54, 1876-1879.
- Nykanen, H., Korechiva, J., 2004. Damage-induced changes in woody plants and their effects on insect herbivore performance: a meta-analysis. *Oikos* 104, 247-268.
- Rosa, L.C., Bemvenuti, C.E., 2004. Infaunal recruitment patterns in soft bottom habitats of the Patos Lagoon estuary, southern Brazil: influence of *Chasmagnathus granulata* (Brachyura, Grapsidae) disturbance. *Iheringia - Série Zoologia* 94, 301-305.
- Sieg, R.D., Wolfe, K., Wiley, D., Ortiz-Santiago, V., Kubanek, J., 2013. Chemical defenses against herbivores and fungi limit establishment of fungal farms on salt marsh angiosperms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 446, 122-130.
- Siegel, S., 1975. *Estatística Não-paramétrica Para as Ciências do Comportamento*. McGraw-Hill, São Paulo, Brasil.
- Silliman, B.R., Zieman, J.C., 2001. Top-down control of *Spartina alterniflora* growth by periwinkle grazing in a Virginia salt marsh. *Ecology* 82, 2830-2845.
- Silliman, B.R., Newell, S.Y., 2003. Fungal-farming in a snail. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 100, 15643-15648.
- Silliman, B.R., Van de Koppel, J., Bertness, M.D., Stanton, L.E., Mendelsohn, I.A., 2005. Drought, snails, and large-scale die-off of southern U.S. salt marshes. *Science* 310, 1803-1806.
- Silva, G.H., Oliveira, C.M., Teles, H.L., Pauletti, M.P., Castro-Gamboa, I., Silva, D.H.S., Bolzani, V.S., Young, M.C., Costa-Neto, C.M., Pfenning, L.H., Berlinck, R.G.S., Araujo, A.R., 2010. Sesquiterpenes from *Xylaria* sp., an endophytic fungus associated with *Piper aduncum* (Piperaceae). *Phytochem. Lett.* 3, 164-167.
- Silva, C.T., 2014. *Composição e densidades da macrofauna bentônica de uma marisma e plano lamoso adjacente do estuário da Lagoa dos Patos, RS - Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso(Oceanologia)*. Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Silveira, E.S., 2012. *Fungos e leveduras na água e plantas macrófitas em decomposição na*

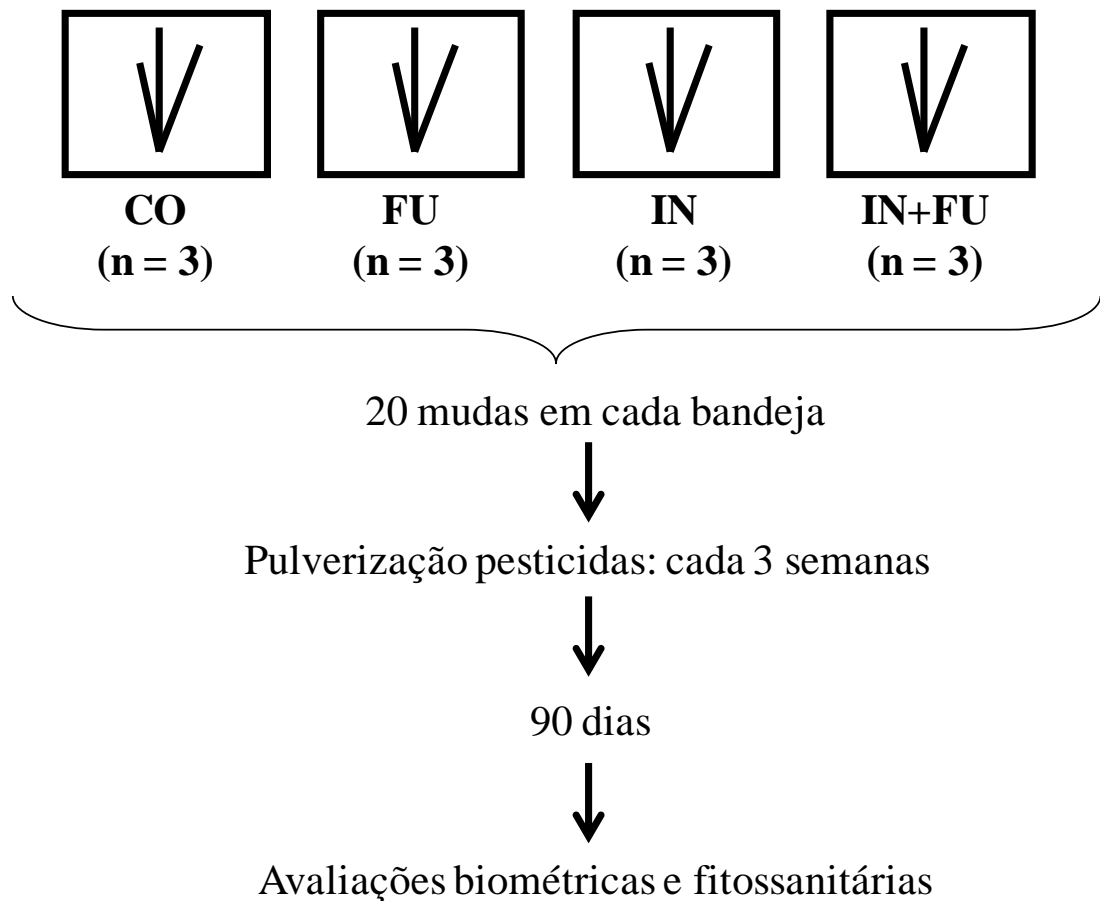
- região estuarina da Lagoa dos Patos e praia do Cassino, RS - Brasil. Tese (Doutorado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande.
- Spivak, E., Anger, K., Luppi, T., Bas, C., Ismael, D., 1994. Distribution and habitat preferences of two grapsid crab species in Mar Chiquita Lagoon (Province of Buenos Aires, Argentina). *Helgolander Meeresunters* 48, 59-78.
- Verkaar, M.J., 1988. Are defoliators beneficial for their host plants in terrestrial ecosystems - a review? *Acta Botanica Neerlandica* 137, 137-152.
- Woodhouse, W.W.Jr., Knutson, P.L., 1982. Atlantic coastal marshes. In: Lewis, R.R. (Ed.), *Creation and Restoration of Coastal Plant Communities*. CRC Press, USA, pp. 45-109.
- Yamauchi, A., Yamamura, N., 2004. Herbivory promotes plant production and reproduction in nutrient-poor conditions: effects of plant adaptive phenology. *The American Naturalist* 163, 138-153.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical analysis*. Pearson Prentice-Hall, New Jersey.

CONCLUSÕES GERAIS

- Através dos experimentos realizados, foi possível observar uma grande eficiência do inseticida Malathion no controle da herbivoria do afídeo *H. setariae* sobre mudas de *S. alterniflora* produzidas em uma estufa não climatizada.
- Foi verificado um alto impacto de afídeos e fungos no desenvolvimento das mudas de *S. alterniflora* que não foram pulverizadas com inseticida.
- A aplicação do fungicida Daconil em plantas de *S. alterniflora*, sob intenso pastoreio de afídeos no ambiente de estufa, não causou efeitos tóxicos no desenvolvimento da planta, no entanto, demonstrou não afetar/diminuir a ocorrência de fungos e manchas nas folhas.
- As lesões e possivelmente a própria secreção da melada (“honeydew”) durante a alimentação dos afídeos nas folhas de *S. alterniflora* acarretou na facilitação da infecção de fungos nessas plantas.
- O caranguejo *N. granulata* causou um grande impacto no crescimento/desenvolvimento das mudas transplantadas de *S. alterniflora* em uma zona entremarés da Ilha da Pólvora.
- As lesões simuladas desses caranguejos facilitaram na infecção de fungos nas folhas de *S. alterniflora*, assim como na aceleração da senescência dessas folhas. Por outro lado, esses microorganismos não afetaram marcadamente os parâmetros biométricos das plantas de *S. alterniflora* nessa área transplantada. A pulverização do fungicida Daconil em plantas de *S. alterniflora*, transplantadas para um plano entremarés na região estuarina, limitou a infecção de fungos (biomassa fúngica) em folhas lesionadas, mas não afetou os parâmetros biométricos das plantas. Portanto, não se recomenda a utilização desse pesticida em mudas transplantadas de *S. alterniflora*, quando as condições ambientais forem semelhantes às observadas na zona entremarés da Ilha da Pólvora.

ANEXO 1

Desenho amostral do cultivo de *Spartina alterniflora* em bandejas sob diferentes tratamentos realizados em uma estufa não climatizada (Rio Grande - RS) durante 90 dias.



Legendas:

CO = controle (sem pesticidas)

IN = aplicação de inseticida

FU = aplicação de fungicida

IN+FU = aplicação conjunta de inseticida e fungicida

ANEXO 2

Folhas de *Spartina alterniflora* digitalizadas que foram coletadas em uma estufa não climatizada: sadia (lado esquerdo; tratada com inseticida e fungicida) x altamente infestada (lado direito; não pulverizada com inseticida ou fungicida)



ANEXO 3

Fotografia de uma folha de *Spartina alterniflora* lesionada naturalmente por um caranguejo *Neohelice granulata* em um plano de lama entremarés na Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).



ANEXO 4

Desenho amostral das gaiolas de exclusão e vazadas com mudas transplantadas de *Spartina alterniflora* durante o desenvolvimento do Experimento 1 em um plano entremarés na Ilha da Pólvora.



2 folhas lesionadas de cada haste principal



Pulverização fungicida: semanal



21 dias



Avaliações biométricas e ergosterol

Legendas:

VA = gaiolas vazadas sem fungicida

EX = protegidas sem lesões e sem fungicida

VF = gaiolas vazadas com fungicida

EF = protegidas sem lesões e com fungicida

ELF = protegidas com lesões simuladas e com fungicida

EL = protegidas com lesões simuladas e sem fungicida

ANEXO 5

Gaiolas de exclusão e vazadas com plantas de *Spartina alterniflora* durante o desenvolvimento do Experimento 1 em um plano entremarés na Ilha da Pólvora (Rio Grande, RS).



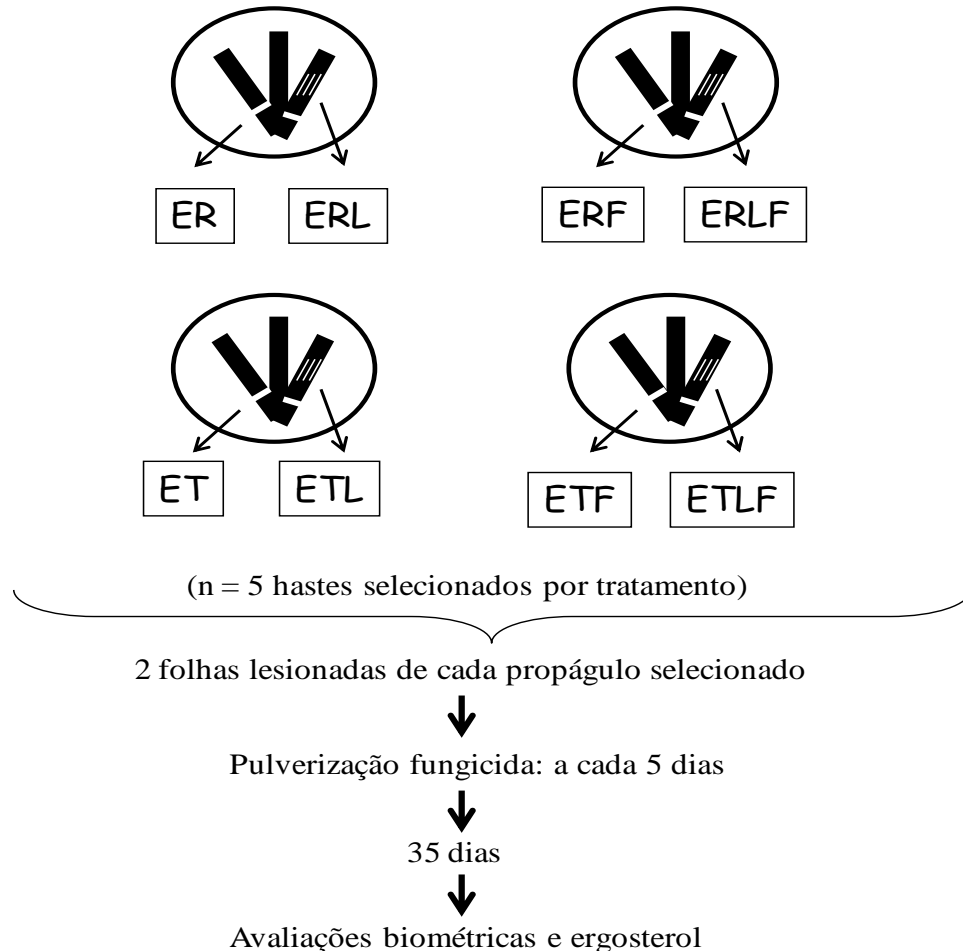
ANEXO 6

Fotografias de lesões simuladas do caranguejo *Neohelice granulata* em folhas de *Spartina alterniflora*. (A) Lesões recém-estabelecidas; (B) Lesões após 35 dias do pastoreio simulado recobertas por biomassa fúngica.



ANEXO 7

Desenho amostral das gaiolas de exclusão com plantas (rebrote e transplantadas) de *Spartina alterniflora* durante o desenvolvimento do Experimento 2 em um plano entremarés na Ilha da Pólvora.



Legendas:

ER = rebrotes sem lesões foliares em ausência de fungicida
ERL = rebrotes com lesões foliares em ausência de fungicida
ERF = rebrotes sem lesões foliares em presença de fungicida
ERLF = rebrotes com lesões foliares em presença de fungicida
ET = mudas transplantadas sem lesões foliares em ausência fungicida
ETL = mudas transplantadas com lesões foliares em ausência de fungicida
ETF = mudas transplantadas sem lesões foliares em presença de fungicida
ETLF = mudas transplantadas com lesões foliares em presença de fungicida