

**MATHIAS FERRARI ROCKENBACH**

**Análise histopatológica e proteômica da resistência/suscetibilidade  
do tecido foliar de macieira (*Malus domestica* Borkh) a  
*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.**

Dissertação apresentada ao Programa  
de Recursos Genéticos Vegetais da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina, como requisito à obtenção  
do título de Mestre em Ciências, Área  
de Concentração em Recursos  
Genéticos Vegetais

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra**

**FLORIANÓPOLIS, 2012**

Aos meus pais, Elena e Eliseu, pela força e dedicação realizada para que os objetivos sejam alcançados;

Às minhas avós Elena e Alvina, pela educação e presença em todo momento da vida;

Aos meus tios Santiago e Noela pela afeição, acompanhamento, e incentivo sempre;

Aos meus amigos e família em geral.

## **Agradecimentos**

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) da Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de desempenhar este trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos;

Ao Professor Miguel Pedro Guerra pela orientação, paciência, ensinamentos, e incentivos durante a realização deste trabalho;

Aos Professores do curso, agradecimentos especiais aos Professores Dr. Rubens O. Nodari, Dr. Marcelo Maraschin, e Dr. Marciel J. Stadnik

À Prof. Dra. Ana Carolina Maisonnave Arisi e todo o pessoal da CAL, pela disposição do laboratório e auxílios oferecidos para este trabalho;

Ao Prof. Dr. Hernán Terenzi e todo o pessoal do Centro de Biologia Molecular Estrutural (CEBIME) pela disposição dos equipamentos, e auxílios oferecidos para este trabalho;

À Prof. Dra. Adriana Dantas, Dr. José Itamar Boneti, Dr. Yoshinori Katsurayama, e todo o pessoal da Estação Experimental EPAGRI/São Joaquim que colaborou ao desempenho deste trabalho;

À Associação Brasileira de Produtores de Maçãs (ABPM);

Ao Javier, Luciano, Eduardo, e todo o pessoal do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) pelos recursos oferecidos para a preparação e observação de amostras;

Ao Centro Politécnico da Universidade federal do Paraná, pelos recursos oferecidos para a preparação de amostras;

Ao Laboratório de Materiais (LabMat) da UFSC pelos recursos oferecidos para a preparação de amostras;

Ao Instituto Euvaldo Lodi de Santa Catarina (IEL/SC) pelos auxílios fornecidos ao desempenho deste trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) pela amizade, afeto, colaboração e parceria durante todo o desempenho deste trabalho;

À Dra. Gabriela Cangahuala-Inocente e Dr. Douglas Steinmacher pelo constante acompanhamento e orientações durante a realização deste trabalho;

À Maria Carolina Andrada Nascimento, colega que me iniciou nas metodologias associadas à proteômica;

À Camila Martins, pelo acompanhamento e auxílio no desempenho de atividades relacionadas a este trabalho;

À Dra. Melissa Sperotto, quem me ajudou e incentivou de maneira especial para o início deste trabalho;

À Giana Cris Rodrigues e Maria Carolina Rodrigues, pela amizade e amor concedidos;

Ao amigo Roberto Apel, pelos conselhos e direcionamentos;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## Sumário

<b>Lista de Abreviaturas</b>	<b>vii</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xi</b>
<b>CAPITULO I – Introdução e justificativa</b>	<b>15</b>
<b>Resumo</b>	<b>16</b>
<b>Abstract</b>	<b>17</b>
<b>1- Introdução</b>	<b>18</b>
<b>2- Objetivo geral</b>	<b>26</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>27</b>
<b>CAPITULO II – Análises histopatológicas do tecido foliar de macieira (<i>Malus domestica</i> Borkh.) cvs. Fuji e Gala, inoculado com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i></b>	<b>35</b>
<b>Resumo</b>	<b>36</b>
<b>Abstract</b>	<b>37</b>
<b>1- Introdução</b>	<b>38</b>
<b>2- Material e métodos</b>	<b>39</b>
2.1- Inoculação de plantas de macieira cvs. Fuji e Gala, com o isolado SJ197 do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	
2.2- Coleta e preparação das amostras para observações ao Microscópio Óptico	<b>39</b>
2.2.1- Obtenção e fixação das amostras	<b>39</b>
2.2.2- Coloração das amostras com azul de toluidina	<b>40</b>
2.3- Coleta e preparação das amostras para observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura	<b>40</b>
2.3.1- Fixação das amostras	<b>40</b>
2.3.2- Ponto crítico, montagem em suportes e metalização das amostras	<b>41</b>
<b>3- Resultados e discussão</b>	<b>41</b>
3.1- Inoculações das plantas de macieira cvs. Fuji e Gala com <i>C. gloeosporioides</i>	
3.2- Observações ao Microscópio Óptico	<b>43</b>
3.3- Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>60</b>
<b>CAPITULO III – Análises Proteômicas de tecido foliar de macieira (<i>Malus domestica</i> Borkh.) cvs. Fuji e Gala, inoculado com <i>Colletotrichum gloeosporioides</i></b>	<b>65</b>
<b>Resumo</b>	<b>66</b>

<b>Abstract</b>	<b>67</b>
<b>1- Introdução</b>	<b>68</b>
<b>2- Material e métodos</b>	<b>69</b>
2.1- Extração de proteínas totais de tecido foliar de macieira cvs. Fuji e Gala, inoculado com <i>C. gloeosporioides</i>	<b>69</b>
2.2- Quantificação de proteínas	<b>70</b>
2.3- Preparação dos géis bidimensionais	<b>70</b>
2.4- Análises dos géis, digestão e obtenção dos perfis de massa das proteínas relevantes, e identificação das proteínas	<b>71</b>
<b>3- Resultados e discussão</b>	<b>72</b>
3.1- Análises comparativas	<b>72</b>
3.1.1- Rendimentos da extração total de proteínas de tecido foliar de macieira cvs. Fuji e Gala	<b>72</b>
3.1.2- Comparação dos perfis proteicos do tecido foliar de macieira inoculado com <i>C. gloeosporioides</i>	<b>72</b>
3.2- Identificação de proteínas exclusivas expressadas pelas cvs. Fuji e Gala em resposta ao ataque pelo <i>C. gloeosporioides</i>	<b>76</b>
3.2.1- Espectrometria de massa e identificação de proteínas no banco de dados	<b>76</b>
<b>4- Conclusões</b>	<b>84</b>
<b>5- Considerações finais e perspectivas futuras</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE</b>	<b>95</b>

## Lista de Abreviaturas

ATP – Adenina trifosfato  
ALDH – Aldeído desidrogenase  
Avr – Avirulência  
BSA – Albumina de soro bovino  
CC – hélice super-enroscada  
CHAPS – 3-[(3-colamidopropil) dimetilamônio] -1 -propanossulfonato  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
DTT – Ditioneitol  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
EREBP – Proteína de união a elemento de resposta ao etileno  
ET – Etileno  
GST – Glutathione-S-Transferase  
GT – Glicosiltransferase  
GTP – Guanidina trifosfato  
HAMP – Padrões moleculares associados ao hospedeiro  
HR – Reação de hipersensibilidade  
INA – Ácido 2,6-dicloroisonicotínico  
ISR – Resistência sistêmica induzida  
JA – Ácido jasmônico  
Kcl – Cloreto de potássio  
LRR – Repetidos ricos em leucina  
LPS – Lipopolissacarídeo  
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno  
MeSA – Metil-Salicilato  
MET – Microscópio eletrônico de transmissão  
MEV – Microscópio eletrônico de varredura  
MFG – Mancha foliar da glomerella  
NAD – Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NBS – Sitio de união a nucleotídeo  
PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos  
PGIP – Proteínas inibidoras de poligalacturonases  
PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonilo  
PR – Relacionado a patógeno  
PTM – Modificações pós-traducionais  
P5C – Pirrolina-5-carboxilato  
P5CDH - Delta(1)-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase

RGA – Genes de resistência análogos  
RNAase – Ribonuclease  
SA – Ácido salicílico  
SAG – Ácido salicílico beta – glucosídeo  
SAR – Resistência sistêmica adquirida  
TEMED – Tetrametiletilenodiamina  
TFA – Ácido trifluoroacético  
TIR – Domínio tipo Toll e IL-1



## Lista de Tabelas

**Tabela 1:** Rendimentos médios (mg de proteínas totais/ g de tecido foliar) das extrações de proteínas totais dos tecidos foliares das cvs. Fuji e Gala inoculado com *C. gloeosporioides*.

**Tabela 2:** Número das sobreposições detectados (“matches”) entre as manchas totais detectadas, nos géis de referência de cada tratamento, das cvs. Fuji e Gala, submetidas à inoculação com *C. gloeosporioides*.

**Tabela 3:** Número de sobreposições exclusivas detectadas em cada tratamento de cada cultivar, quando foram comparados os grupos de géis de diferentes tratamentos, da mesma cultivar.

**Tabela 4:** número de sobreposições detectadas exclusivamente em cada tratamento e exclusivas cada cultivar, quando foram comparados os grupos de géis de cada tratamento de cada cultivar, entre si.

**Tabela 5:** Número de sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar de macieira, identificadas quando foram comparadas as listas de sobreposições exclusivas expostas nas tabelas 3 e 4.

**Tabela 6:** Proteínas identificadas da cv. Fuji, expressadas exclusivamente às 24 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Acesso: código de identificação das proteínas (número de acesso); Query coverage: correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; E-value: Valor esperado; Max Ident: porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. PI exp: Ponto Isoelétrico experimental; MM exp: Massa Molecular experimental; PI teo: Ponto Isoelétrico teórico; MM teo: Massa Molecular teórica.

**Tabela 7:** Proteínas identificadas da cv. Fuji, expressadas exclusivamente às 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Acesso: código de identificação das proteínas (número de acesso); Query coverage: correspondência, em forma de porcentagem, entre a

sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; E-value: Valor esperado; Max Ident: porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. PI exp: Ponto Isoelétrico experimental; MM exp (kDa): Massa Molecular experimental; PI teo: Ponto Isoelétrico teórico; MM teo (kDa): Massa Molecular teórica.

**Tabela 8:** Proteínas identificadas da cv. Gala, expressadas exclusivamente às 24 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Acesso: código de identificação das proteínas (número de acesso); Query coverage: correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; E-value: Valor esperado; Max Ident: porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. PI exp: Ponto Isoelétrico experimental; MM exp (kDa): Massa Molecular experimental; PI teo: Ponto Isoelétrico teórico; MM teo (kDa): Massa Molecular teórica.

**Tabela 9:** Proteínas identificadas da cv. Gala, expressadas exclusivamente às 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Acesso: código de identificação das proteínas (número de acesso); Query coverage: correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; E-value: Valor esperado; Max Ident: porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. PI exp: Ponto Isoelétrico experimental; MM exp: Massa Molecular experimental (kDa); PI teo: Ponto Isoelétrico teórico; MM teo (kDa): Massa Molecular teórica.

## Lista de Figuras

**Figura 1:** Estratégias de infecção desenvolvidas pelas espécies do gênero *Colletotrichum*. **a-** colonização intramural subcuticular; **b-** colonização intracelular. **S:** esporo; **A:** apressório; **E:** células epidérmicas; **M:** células do mesófilo; **IV:** vesículas de infecção; **PH:** hifa primária; **SH:** hifa secundária (necrotrófica). 1,2,3 e 4, referem-se à sequência dos estados de desenvolvimento do patógeno no hospedeiro (adaptado de Perfect et al, 1999).

**Figura 2: A e B** - Plantas cv. Gala após 48 horas da inoculação mostrando os sintomas típicos da MFG nas folhas superiores. Os sintomas aparecem como pequenas manchas de cor vermelho intenso dispersas pelas folhas. **C e D** – Plantas cv. Fuji após 48 horas da inoculação. Não se observam sintomas da MFG nas folhas desta cultivar.

**Figura 3:** **A** - Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala, sem inoculação com *C. gloeosporioides*; **B** – Corte transversal de tecido foliar da cv. Fuji, sem inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam vesículas distribuídas internamente nas células epidérmicas que reagiram com o corante resultando numa cor azul-esverdeada. **pp:** parênquima paliçádico; **pl:** parênquima lacunoso; **es:** estômato; **ce:** célula epidérmica; **ib:** idioblasto.

**Figura 4: A e B** - Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 3 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente; **C e D** – Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 12 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente. As setas azuis indicam vesículas distribuídas internamente nas células epidérmicas que reagiram com o corante. **pp:** parênquima paliçádico; **pl:** parênquima lacunoso; **ib:** idioblasto.

**Figura 5:** **A e B** - Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 24 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente; **C e D** – Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente. As setas vermelhas na figura A indicam estruturas que podem corresponder ao

patógeno. pp: parênquima paliçádico; pl: parênquima lacunoso; ce: célula epidérmica.

**Figura 6: A e B**– Superfície abaxial do tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 3 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente; **C e D** – Superfície adaxial da cv. Gala após 3 horas da inoculação. As setas azuis indicam o conídio, enquanto que as setas vermelhas indicam um tubo germinativo em crescimento.

**Figura 7: A, C e E** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Gala após 12 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. **B, D e F** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Fuji após 12 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam os conídios germinados, enquanto que as setas vermelhas indicam os apressórios, as setas verdes indicam tubos germinativos em crescimento, e as setas amarelas indicam degradações da cutícula sobre o tecido foliar.

**Figura 8: A, C e E** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Gala após 24 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. **B, D e F** - Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Fuji após 24 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam os conídios germinados, enquanto que as setas vermelhas indicam os apressórios, as setas verdes indicam os tubos germinativos em crescimento, as setas amarelas indicam degradações da cutícula sobre o tecido foliar, e os círculos laranjas indicam conídios em crescimento.

**Figura 9: A, C e E** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Gala após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*; **B, D e E** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Fuji após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam os conídios germinados, enquanto que as setas vermelhas indicam apressórios, as setas verdes indicam tubos germinativos em crescimento, as setas amarelas indicam degradações da cutícula sobre o tecido foliar, e os círculos laranjas indicam conídios em crescimento.

**Figura 10:** Figura 10: Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Fuji, extraídas às 24 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as

sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Fuji (ver Tabela 3); os círculos cor laranja (marcados com o número identificador da mancha - “spot ID”) indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.

**Figura 11:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Fuji, extraídas às 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Fuji (ver Tabela 3); não foram detectadas sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.

**Figura 12:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Gala, extraídas às 24 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Gala (ver Tabela 4); os círculos cor laranja (marcados com o número identificador da mancha - “spot ID”) indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.

**Figura 13:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Gala, extraídas às 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Gala (ver Tabela 4); os círculos cor laranja (marcados com o número identificador da mancha - “spot ID”) indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.



## **CAPITULO I – Introdução e justificativa**

## Resumo

A maçã é a segunda fruta de maior importância econômica no Brasil, e Santa Catarina é o principal Estado produtor com 53% nacional da produção total do Brasil. A sua maçã se concentra principalmente em duas cultivares, Gala e Fuji, que representam em torno de 95% da produção. Esta concentração em poucas variedades predispõe à ocorrência de várias doenças, dentre elas aquelas conhecidas como “podridão amarga” e “mancha foliar da *Glomerella*” (MFG), as quais causam elevadas perdas na produção. Estas doenças são ocasionadas pelo ataque do patógeno fúngico *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., responsável pela doença nos frutos e nas folhas da macieira, respectivamente. A MFG é uma doença típica de verão, podendo provocar desfolhamento superior a 75% e, como consequência, reduzir drasticamente a produção das plantas no ano seguinte. Esta doença ocorre principalmente na cv. Gala, enquanto que a cv. Fuji mostra-se resistente a ela. Recomendam-se várias medidas para controlar esta moléstia nas cvs. suscetíveis, medidas estas majoritariamente associadas ao controle com produtos químicos. Os resultados, contudo, são variáveis e pouco animadores. A incorporação de resistência nas cultivares suscetíveis para estas e outras moléstias poderá reduzir o uso de fungicidas em mais de 80%. O presente trabalho objetivou analisar o patossistema *C. gloeosporioides* – *M. Domestica* desde uma perspectiva microscópica, a qual visa analisar a dinâmica de crescimento do *C. gloeosporioides* ao longo do tempo (até 48 horas após a inoculação do patógeno sobre folhas de macieira cvs. Fuji e Gala) e as diferenças que apresentam os tecidos foliares das cvs, Fuji e Gala em resposta ao ataque pelo patógeno, até 48 horas da inoculação, mediante observações ao microscópio óptico e microscópio eletrônico de varredura (MEV). O trabalho objetivou também empregar metodologias associadas à proteômica, visando identificar as diferenças na expressão proteica que apresenta o tecido foliar das cvs. Fuji e Gala em resposta ao ataque pelo *C. gloeosporioides*, e identificar a estrutura primária das proteínas expressadas exclusivamente em cada tratamento, para cada cultivar, até 48 horas da inoculação com o patógeno.

**Palavras chave:** MFG. MEV. Patossistema. Proteômica. expressão protéica.



## Abstract

The apple is the second most economically important fruit in Brazil, and Santa Catarina State is the main producing region with 53% of the total national production. The apple production is concentrated mainly in two cultivars Gala and Fuji, which represent around 95% of production. This concentration in a few varieties predisposes to several diseases, among them those known as “bitter rot” and “Glomerella leaf spot” (GLS), which cause high yield losses. These diseases are caused by the attack of the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., responsible for the disease on fruits and leaves of apple trees, respectively. Bitter rot and MFG are typically summer diseases, when they can cause defoliation above 75% and, consequently, dramatically reduce the production plant next year. The MFG occurs mainly in cv. Gala, while cv. Fuji is resistant to it. It is recommended several measures to control this disease in the cvs. susceptible, mostly associated with these measures to control with chemicals. The results, however, are variable and not very encouraging. The incorporation of resistance in cultivars susceptible to these and other diseases may reduce the use of fungicides in over 80%. This study aimed to analyze the pathosystem *C.gloeosporioides* – *M. domestica* from a structural perspective, which aimed to evaluate the growth dynamics of *C. gloeosporioides* over time up to 48 hours after inoculation of the pathogen on leaves of apple cvs. Fuji and Gala and the differences in the leaf tissue of cvs. Fuji and Gala in response to pathogen attack by up to 48 hours after inoculations, by optical microscopy and scanning electron microscope (SEM). The work also aimed to employ methodologies associated with proteomics, to identify differences in protein expression that has the leaf tissue of cvs. Fuji and Gala in response to the attack of *C. gloeosporioides*, and to identify the primary structure of proteins occurring exclusively in each treatment in each cultivar 48 hours after inoculation with the pathogen.

**Keywords:** GLS. SEM. Pathosystem. Proteomics. Protein expression.

## 1- Introdução

### Situação atual da produção de maçã no Brasil

A cadeia produtiva da maçã é importante em vários países do mundo. O Brasil se encontra entre os dez países de maior produção, somando em torno de 2% da produção total mundial, o que representa 1,356 milhões de toneladas produzidas, concentradas numa área de cerca de 40 mil hectares. A região do Sul do Brasil é responsável por 99,8% dessa produção total, sendo Santa Catarina o Estado de maior produção com 53%, seguido do Rio Grande do Sul com 42%. Nestas regiões, a produção se concentra nas cultivares Gala (46%), Fuji (45%) e Golden Delicious (6%), somando 95% da produção nacional (ICEPA, 2011).

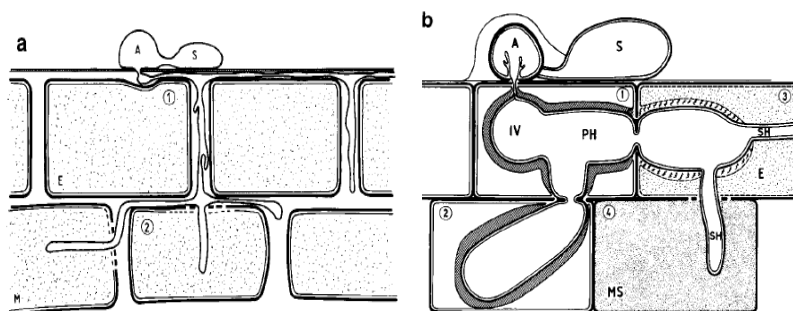
Embora Santa Catarina venha apresentando incrementos anuais na produção de maçã em relação às safras anteriores, na última safra de 2010/2011 a produção mostrou uma queda de cerca de 2% em relação à safra anterior, ocasionada principalmente por condições climáticas adversas e ocorrência de pragas (ICEPA, 2011). As principais doenças na produção de maçã na região Sul do Brasil são as conhecidas como “podridão amarga” e “mancha foliar da *Glomerella*” (MFG), as quais causam elevadas perdas na produção nos países com clima tropical e subtropical (Valdebenito-Sanhueza, 1999; Borve & Stensvand, 2007; Bogo *et al.*, 2010). Estas doenças fúngicas tem sido detectadas desde o estado do Paraná até o Rio Grande do Sul, incluindo a serra catarinense com climas mais frios (Leite *et al.*, 1988; Boneti *et al.*, 1999; Bogo *et al.*, 2010) são ocasionadas pelo ataque de um patógeno fúngico, o qual em sua fase teleomórfica (sexuada) é conhecido como *Glomerella cingulata* e ocasiona a doença nos frutos conhecida como “podridão amarga”, e em sua fase anamórfica (assexuada) é conhecido como *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc., responsável pela doença nas folhas da macieira (MFG) (Crusius *et al.*, 2002; González & Sutton, 2005; González *et al.*, 2006; Hyde *et al.*, 2009; Bonett *et al.*, 2010). Esta doença ocorre principalmente na cv. Gala, sendo também conhecida como Mancha Foliar da Gala. Já a cv. Fuji mostra-se resistente a este patógeno, não desenvolvendo a doença, e a principal justificativa para este fato é que a MFG afeta as cultivares de macieiras derivadas da cv. Golden Delicious (Becker *et al.*, 2000; Katsurayama *et al.*, 2001; Costa, 2008). Desta maneira, a cv. Gala (principal cultivar plantada no Brasil)

apresenta alta suscetibilidade, enquanto a cv. Fuji, a segunda mais cultivada, não é afetada. Os sintomas iniciais da doença estão associados à ocorrência de manchas vermelho-arroxeadas, já visíveis 48h após o início da infecção e que evoluem para manchas necróticas. As folhas lesionadas amarelecem e caem precocemente, entre oito e dez dias (Taylor, 1970; Valdebenito-Sanhueza, 1999; Crusius *et al.*, 2002). A rapidez e agressividade do ataque por *C. gloeosporioides* estão diretamente relacionadas com as condições de temperatura e umidade relativa do ar, e os verões com altas temperaturas acompanhados por elevados índices de precipitações, favorecem o ataque pelo patógeno (Gonzalez & Sutton, 2005; Bogo *et al.*, 2010). A MFG é uma doença típica de verão, e pode provocar desfolhamento superior a 75% e, como consequência, reduzir drasticamente a produção das plantas no ano seguinte. Recomendam-se várias medidas para controlar esta moléstia nas cvs. suscetíveis, medidas estas majoritariamente associadas ao controle com produtos químicos (Araujo *et al.*, 2008, 2010; Kowata *et al.*, 2010; Bogo *et al.*, 2011). Os resultados, contudo, são variáveis e pouco animadores. Assim, a incorporação de resistência nas cultivares suscetíveis a estas doenças poderia reduzir em grande escala, senão completamente, o uso desses produtos químicos (Denardi *et al.*, 2003; Da Silva, 2007). Os prejuízos ocasionados pelo ataque de fitopatógenos sobre cultivares agrícolas de valor econômico, representam um enorme desafio a ser superado pela pesquisa agrícola. As perspectivas abrangem o uso de ferramentas biotecnológicas para ampliar a resistência das plantas como forma de aumentar a produtividade, reduzir custos de produção e os impactos na saúde humana e ao meio ambiente (Denardi *et al.*, 2003; Da Silva, 2007; Rollemborg, 2008). Assim, a associação crescente entre as biotecnologias, o melhoramento genético clássico e as boas práticas de manejo têm revelado impulsos consideráveis sobre a produtividade e a qualidade desta produção (Da Silva, 2007).

### **Estratégias de infecção desenvolvidas no gênero *Colletotrichum***

O gênero *Colletotrichum* consiste num vasto grupo de fungos Ascomicetos integrado por várias espécies patogênicas, capazes de causar perdas significantes na produção agrícola em regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas (Bailey & Jeger, 1992 ; Wharton & Diéguez-

Uribeondo, 2004; Bonett *et al*, 2010). Devido ao amplo espectro de infecção sobre diversos hospedeiros, muitas espécies deste gênero têm sido usado como modelo de estudo para as interações planta-patógeno (Perfect *et al*, 1999; Thaug, 2008). Entre algumas das espécies de *Colletotrichum* que têm sido bem estudadas, destacam-se *C. lindemuthianum* (Sacc. et Mgn.) Bri et Cav. (Roca *et al*, 2003,2004), *C. destructivum* (Shen *et al*, 2001), *C. acutatum* (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004) e *C. gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. (Valdebenito-Sanhueza *et al*, 2002), todas elas sendo agentes causais de doenças tipo antracnoses, ferrugens e manchas foliares (Benhamou *et al*, 1991;). As espécies do gênero *Colletotrichum* tem desenvolvido diferentes estratégias de infecção entre os diferentes hospedeiros, as quais podem agrupar-se como: a) colonização intramural subcuticular; e b) colonização intracelular (Perfect *et al*, 1999; Roca *et al*, 2003; Mould *et al*, 1991; Wharton and Julian, 1996; Prusky *et al*, 1991; Shen *et al*, 2001; Bonett *et al*, 2010) (Figura 1). No primeiro caso, os conídios se aderem e germinam na superfície do hospedeiro, até formar um apressório que degrada a cutícula do tecido hospedeiro e por onde formam-se as estruturas que penetram subcuticularmente, formando uma rede intramural de hifas infecciosas inter e intracelularmente; esta rede



**Figura 1:** Estratégias de infecção desenvolvidas pelas espécies do gênero *Colletotrichum*. **a-** colonização intramural subcuticular; **b-** colonização intracelular. **S:** esporo; **A:** apressório; **E:** células epidérmicas; **M:** células do mesófilo; **IV:** vesículas de infecção; **PH:** hifa primária; **SH:** hifa secundária (necrotrófica). 1,2,3 e 4 , referem-se à sequência dos estados de desenvolvimento do patógeno no hospedeiro (adaptado de Perfect *et al*, 1999).

de hifas degrada progressivamente o tecido hospedeiro até necrosá-lo (Perfect *et al*, 1999; Shen *et al*, 2001). No segundo caso, após a penetração cuticular, as hifas fúngicas crescem no interior do lúmen celular sem penetrar no protoplasto do hospedeiro, isto é, entre as membranas plasmáticas e a parede celular. Após a colonização de várias células, as hifas infecciosas dão lugar a hifas secundárias necrotróficas com as quais o fungo causa uma degradação extensiva das células do hospedeiro, tornando finalmente os sintomas visíveis ( Latunde-Dada *et al*, 1996; Perfect *et al*, 1999; Shen *et al*, 2001). Estes fungos capazes de desenvolver biotrofia e necrotrofia durante as diferentes fases da infecção no hospedeiro, são conhecidos como hemibiotróficos ou biotróficos facultativos (Benhamou *et al*, 1991; Shen *et al*, 2001). Para *C. gloeosporioides*, por exemplo, tem sido reportado as duas estratégias de infecção (Prusky *et al*, 1991; Perfect *et al*, 1999). Em *C. lindemuthianum* tem sido relatado eventos de anastomose conidial como outra estratégia desenvolvida durante a infecção (Roca *et al*, 2003,2004).

As sinalizações superficiais que ocorrem entre o tecido hospedeiro e a superfície do patógeno uma vez que ocorre o encontro entre ambos, constituem um aspecto determinante nas primeiras fases do processo de infecção do fungo (Kolattukudy *et al*, 1995; Perfect *et al*, 1999). Se as sinalizações entre ambas superfícies são reconhecidas favoravelmente pelo patógeno, este germina e pode formar um tubo germinativo que penetra diretamente o tecido hospedeiro, ou pode formar um apressório que finalmente formará uma estrutura infecciosa que penetrará subcuticularmente o tecido hospedeiro (Kolattukudy *et al*, 1995). Este processo de infecção pode ser disparado tanto por sinais topográficos quanto por sinais químicos presentes na superfície do tecido hospedeiro. Componentes cuticulares e ceras superficiais fazem parte do conjunto químico de sinais que disparam a germinação de conídios e formação de apressórios, mediante o reconhecimento por parte dos receptores (elicitors) moleculares presentes nos componentes de parede dos patógenos dos componentes químicos que constituem a cutícula do tecido hospedeiro, e a transdução desses sinais a través das células do patógeno em crescimento (Kolattukudy *et al*, 1995).

Neste sentido, técnicas moleculares tem sido utilizadas para a identificação de genes e proteínas que são ativados e expressadas, respectivamente, durante as diferentes fases de desenvolvimento do patógeno sobre o hospedeiro, tais como a adesão (Liu & Kolattukudy,

1998) formação de apressório (Hwang & Kolattukudy, 1995) , síntese de melanina (Takano *et al*, 1995), sinalizações (Buhr *et al.*,1996), biotrofia (Perfect *et al.*, 1998) e necrotrofia (Benhamou *et al*, 1991; Hwang *et al*, 1995; Stephenson *et al*, 1997). Até então, têm sido identificados vários genes e proteínas que são ativados e expressados respectivamente, já seja nas células do tecido hospedeiro (como mecanismo de resposta ao ataque) como nas células fúngicas (Perfect *et al*, 1999). Entre as proteínas expressadas pelos fungos durante a infecção, as hidroxilases fúngicas (endo-poligalacturonases, cutinases, etc...) liberadas no tecido hospedeiro para degradar a parede vegetal tem sido amplamente estudadas, tanto pela sua importância durante a infecção sobre o tecido hospedeiro como por induzir (indiretamente) mecanismos de defesa nas plantas atacadas (Benhamou *et al*, 1991). Por exemplo, as endo-poligalacturonases clivam os enlaces entre os resíduos de ácido D-galacturônico e de homogalacturonana não metilada (um dos maiores componentes da pectina), e são umas das primeiras enzimas a serem secretadas (Di Mateo *et al*, 2003). A atividade enzimática das endo-poligalacturonases resulta em alterações na parede celular das células vegetais que vão acompanhadas pela liberação de fragmentos pécticos em sítios específicos nas células hospedeiras, tais como os espaços intercelulares e no citoplasma em forma de agregados (Benhamou *et al*, 1991); desta forma, os oligogalacturônidos atuam como elicitores dos mecanismos de defesa na planta (Galletti *et al*, 2009; Attaran, 2010). Neste sentido, uma das respostas desenvolvidas pelas plantas consiste na ativação de genes *pgip* e a tradução das proteínas que eles codificam, proteínas inibidoras de poligalacturonases fúngicas (PGIP – polygalacturonase inhibiting protein) as quais reconhecem e se unem às poligalacturonases fúngicas mediante seu domínio LRR (Di Mateo *et al*; 2003; Sicilia *et al*, 2005; Attaran, 2010; Benedetti *et al*, 2011). Outros componentes da parede celular fúngica, como a quitina, ergosterol, lipopolissacarídeos (LPSs), glucanos, entre outros, também funcionam como elicitores dos mecanismos de defesa nas plantas, e junto com as enzimas de secreção formam um conjunto de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs – pathogen-associated molecular patterns), os quais atuam como principais responsáveis na iniciação da SAR (Galletti *et al*, 2009; Attaran, 2010).

## Mecanismos de defesa em plantas

As plantas podem ser atacadas por fungos, bactérias, ou vírus, dependendo da espécie e de sua susceptibilidade. Contudo, várias espécies desenvolveram mecanismos de resistência que impedem o ataque ou a proliferação do fitopatógeno. De modo geral, os mecanismos de defesa classificam-se em dois grupos: 1) Resistência sistêmica adquirida (SAR); 2) Resistência sistêmica induzida (ISR). No primeiro caso o elicitor é um agente patogênico ou parasita, e esta resistência é desencadeada primeiramente mediante o reconhecimento por parte dos sistemas de percepção de PAMPs presente nas plantas, e sinalização intracelular dos estímulos gerados pela interação com os PAMPs (Nurnberger & Volker, 2005; Verhagen *et al*, 2006; Galletti *et al*, 2009); logo ocorre a produção de um sinal liberado a partir do sítio de infecção e a translocação deste sinal para outras partes da planta, induzindo dessa maneira reações de defesa em nível sistêmico; esta resistência funciona para um amplo espectro de patógenos microbianos e se mantém na planta por longo prazo (Verhagen *et al*, 2006; Attaran, 2010; Mishina & Zeier, 2007). Algumas evidências indicam que as necroses produzidas pelo patógeno no tecido hospedeiro seriam dispensáveis para a iniciação da SAR (Mishina & Zeier, 2007). De todas maneiras, algumas moléculas químicas também podem disparar a SAR, tais como o ácido salicílico (SA) e o ácido 2,6-dichloroisonicotínico (INA) (Van Loon, 2000). A indução da SAR é acompanhada pelo acúmulo local e sistêmico do SA (Gaffney *et al*, 1993). O SA, um composto fenólico, induz a expressão de genes relacionados à patogenicidade (*PR genes* – pathogen related genes), e as proteínas relacionadas à patogenicidade (proteínas PR – veja a seguir) contribuem diretamente para o estabelecimento da SAR (Vlot *et al*, 2009; Cao *et al*, 1994). Estes genes PR são muitas vezes considerados como genes marcadores da expressão da SAR (Verhagen *et al*, 2006). Por outro lado, evidências indicam que o MeSA (ácido salicílico metilado), molécula derivativa do SA, atua como uma molécula envolvida na sinalização e estabelecimento da SAR em regiões distantes na planta em relação ao sítio de infecção (Park *et al*, 2007). Já na ISR, o agente indutor pode ser de natureza abiótica ou simbiótica, e de forma similar à resistência adquirida elicitando um sistema de defesa na planta de caráter sistêmico mas neste caso, sem provocar sintomas (Da Silva *et al.*, 2008 ; Barros *et al.*, 2010; Attaran, 2010). A ISR é independente da sinalização mediada

por SA, se bem o ácido jasmônico (JA) e o etileno (ET) atuam como moléculas sinalizadoras nesta resistência. Ambos os sistemas já foram identificados em várias espécies.

A presença e ativação de genes de PR, e por tanto o estabelecimento da SAR, consiste em um dos mecanismos de resistência mais difundidos nas plantas. O disparo deste mecanismo de resistência depende da presença de certos genes de avirulência (*Avr*- genes), presentes no organismo infectante (patógeno). Estes genes codificam para proteínas elicitoras, que são reconhecidas por motivos específicos das proteínas PR expressadas no organismo hospedeiro, resultando (a partir desta interação elicitor-proteína PR) na ativação de uma rota fisiológica nas células da planta que culmina com um estado de resistência em nível celular (Belkhadir *et al*, 2004). Segundo as características estruturais das proteínas codificadas pelos genes de resistência (PR), esses genes são classificados em vários grupos e identificados para diversas espécies. Os genes de resistência identificados se relacionam com a conferência de resistência para bactérias, vírus e fungos (Richter, 2000; Lehman, 2002). Por sua parte, as PR possuem dois domínios conservados: a) um domínio de união a nucleotídeos (NBS), ATP ou GTP, classificadas como do tipo TIR (domínio tipo Toll and IL-1) e CC (hélice super-enroscada), segundo a homologia estrutural do domínio NBS com outros receptores; e b) um domínio rico em leucinas (domínio LRR) (Belkhadir *et al*, 2004). Análises de sequencia demonstraram que a especificidade da resistência em resposta ao patógeno reside neste domínio LRR, e sua função encontra-se associada ao reconhecimento de motivos específicos nas proteínas codificadas pelos genes de avirulência (*Avr*- genes). Na atualidade foram identificados vários genes de resistência para diferentes espécies de plantas (*Arabidopsis*, tomate, arroz, maçã, entre outras), e os genes de avirulência, correspondentes no patógeno (Richter, 2000; Lee *et al.*, 2003), assim como os mecanismos de evolução dos genes de resistência. Por exemplo, em várias espécies do gênero *Malus* foi identificado o gene de resistência *Avr*, que confere resistência a *Venturia inaequalis*. Na cv. Fuji foram identificados 11 genes de resistência análogos (RGA), representantes de 5 famílias de RGAs das 11 identificadas entre as espécies de *Malus* (Lee *et al*, 2003).

As variações nos níveis hormonais e de radicais livres (espécies reativas de oxigênio), assim como certas atividades enzimáticas, representam outros mecanismos de resposta desenvolvidos



pelas plantas ao ataque por fitopatógenos (Vlot *et al.*, 2009). Vários metabolitos secundários são sintetizados durante a expressão da resistência, podendo estes ser classificados em três grupos: a) terpenos ; b) compostos fenólicos ; c) compostos nitrogenados (Knudsen *et al.*, 1993; Pichersky *et al.*, 2002; Chehab *et al.*, 2008). Metabolitos derivados de ácidos graxos, tais como o JA, também possuem um importante papel nos mecanismos de defesa. O SA é um dos metabolitos mais estudados em plantas, e atua na expressão de diversos genes, tais como os PR genes, e genes codificantes de enzimas detoxificantes e antioxidantes, como glutatona S-transferases (GSTs) e glicosil-transferases (GTs) (Nawrath & Metraux, 1999; Wang *et al.*, 2002; Edwards *et al.*, 2000). A reação de hipersensibilidade (HR) também vem acompanhada pela acumulação nos níveis de SA (Heath, 2000). O SA também possui funções regulatórias na síntese de certos compostos, como por exemplo o ET e JA, promovendo a síntese do primeiro e reprimindo a síntese do segundo, respectivamente (Vlot *et al.*, 2009). O JA é uma molécula derivativa dos ácidos graxos oxigenados, e provê uma via efetiva de defesa ao ataque por patógenos necrotróficos e herbivoria, mediante a ativação de vários genes e expressão de proteínas (Tumer *et al.*, 2002; Attaran, 2010). Estas e outras interações entre metabolitos secundários determinam a expressão dos mecanismos e resistência em plantas durante o ataque por patógenos.

## 2- Objetivo geral

Este trabalho objetivou:

a) Analisar o patossistema *C. gloeosporioides* – *M. Domestica* sob uma perspectiva estrutural por meio de técnicas microscópicas associada à dinâmica de crescimento do *C. gloeosporioides* sobre folhas de macieira cvs. Fuji e Gala.

b) Identificar e caracterizar proteínas do tecido foliar de macieira (*Malus domestica*) cvs. Fuji e Gala, expressadas exclusivamente durante a resposta ao ataque pelo *Colletotrichum gloeosporioides*.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J.; BORSATO, L.C; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. “ Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da Gala em macieira”. **Tropical Plant Pathology**, **33(2)**: 148-152. 2008.
- ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; MARCIEL J. STADNIK, M.J. “Avaliação de formulações de fosfito de potássio sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* e no controle pós-infeccional da mancha foliar de *Glomerella* em macieira”. **Tropical Plant. Pathology** **35(1)**: 054-059. 2010.
- ATTARAN, E. “Regulation of pathogen-inducible volatile compounds in Arabidopsis and their role in plant defense”. **Tese de doutorado apresentada à Universidade Julius-Maximilians/Wurzburg**. pp. 1-116. 2010.
- BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds).1992. “*Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*”. CAB International. Wallingford UK.
- BARROS, F.; SAGATA, E.; FERREIRA, L.; JULLIATTI, F. “Indução de resistência em plantas contra fitopatógenos”. **Biosci. J.** **26(2)**: 231-239. 2010.
- BECKER, W.F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. “Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira”. **Agropecuária Catarinense**, **13**: 14-20. 2000.
- BELKHADIR, Y.; SUBRAMANIAM, R.; DANGL, J.L. “Plant disease resistance protein signaling, NBS-LRR proteins and their partners”. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, **7**: 391-399. 2004.
- BENEDETTI, M.; LEGGIO, C.; FEDERICI, L.; DE LORENZO, G; PAVEL, N.; CEVONE, F “Structural resolution of the complex between a fungal polygalacturonase and a plant polygalacturonase inhibiting protein by small-angle X-ray scattering”. **Plant. Physiol.**, **157(2)**: 599-607. 2011.

- BENHAMOU, N.; LAFITTE, C.; BARTHE, J.P.; ESQUERRE-TUGAYE, M.T. “Cell surface interactions between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum*”. **Plant Physiol.**, **97**: 234-244. 1991.
- BOGO, A.; DE JESUS, W.; TREZZI, R.; KUHNEM, P.; CESA, L. “Dinâmica temporal da mancha foliar da Gala em macieiras conduzidas sob os sistemas de produção convencional e orgânico”. **Ciência Rural**, **40(2)**: 466-470. 2010.
- BOGO, A.; CASA, R.; RUFATO, L.; KUHNEM, P.; GONÇALVES, M. “Ethylene inhibitor aminoethoxyvinylglycine on *Glomerella* leaf spot in apple cultivar Royal Gala”. **Ciência Rural**, **41(6)**: 925-930. 2011.
- BONETI, J.I.; RIBEIRO, L.G.; KATSURAYAMA, Y. “Manual de identificação de doenças e pragas da macieira”. **Florianópolis: EPAGRI**:48-56. 1999.
- BONNET, L.P.; ALMEIDA, M.; ALVES, R.G.; AQUINO, T.; BERNARDI-WENZEL, J. “Caracterização morfofocultural e infecção cruzada de *Colletotrichum gloeosporioides* agente causal da antracnose de frutos e hortaliças em pós-colheita”. **Ambiência – Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, **6(3)**: 451-463. 2010.
- BORVE, J.; STEVENSAND, A. “*Colletotrichum acutatum* found in apple buds in Norway”. **Online. Plant Health Progress**, doi:10.1094/PHP-2007-0522-01-RS pp.1-4. 2007.
- BUHR, T.L.; OVED, S.; TRUESDELL, G.M.; HUANG, C.; YARDEN, O.; DICKMAN, M.B. “A kinase-encoding gene from *C. trifolii* complements a colonial growth mutant of *Neurospora crassa*”. **Mol. Gen. Genet.**, **251**: 565-572. 1996.
- CAO, H.; BOWLING, S.A.; GORDON, A.S.; DONG, X. “Characterization of an Arabidopsis mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance”. **Plant Cell**, **6**: 1583-1592. 1994.
- CHEHAB, E.W.; RASPI, R.; SAVCENKO, T.; ROWE, H.; NEGRE-ZAKHAROV, F.; KLIEBENSTEIN, D.; DEHESH, K. “Distinct roles of

jasmonates and aldehydes in plant- defense responses. **PLoS ONE**, 4:e1904. Doi:10.1371/journal.pone.0001904. 2008.

COSTA, C.R. “Avaliação da diversidade genética e da resistência à mancha foliar da Gala em acessos de macieira do banco de germoplasma de macieiras de EPAGRI/CAÇADOR”. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina**. pp.1-97. 2008.

CRUSIUS, L.U.; FORCELINI, C.A.; SANHUEZA, R.M.V.; FERNANDES, J.M.C. “Epidemiology of apple leaf spot”. **Fitopatología Brasileira** 27: 65-70. 2002.

DA SILVA, M.F. “Deenvolvimento de um mapa genético de ligação saturado para a região com resistência à mancha foliar da *Glomerella (Colletotrichum gloeosporioides)*”. **Tese de Doutorado apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina**, pp. 1-95. 2007.

DA SILVA, R.; MASSENA, V. ; BALDANI, J. ; OLIVARES, F. “Defesa de plantas contra ataques a fitopatógenos”. **Relatório da Embrapa**. 2008.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M. “Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos”. **Rev. Bras. Frutic.**, 25(3): 494-497. 2003.

DI MATEO, A.; FEDERICI, L.; MATTEI, B.; SALVI, G.; JOHNSON, K.A.; SAVINO, C.; DE LORENZO, G.; TSENOGLOU, D.; CERVONE, F. “The crystal structure of polygalacturonase- inhibiting protein (PGIP), a leucine-rich repeat protein involved in plant defense”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 100(17): 10124-10128. 2003.

EDWARDS, R.; DIXON, D.P.; WALBOT, V. “Plant glutathione S-transferase: enzymes with multiple functions in sickness and in health”. **Trends in Plant Science**, 5(5): 193-198. 2000.

EPAGRI “Centro de Socioeconomia e planejamento agrícola – CEPA”.

**Epagri.** 2011.

GAFFNEY, T.; FRIEDRICH, L.; VERNOOIJ, B.; NEGROTTO, D.; NYE, G.; UKNES, S.; WARD, E.; KESSMAN, H.; RYALS, J. "Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance". **Science**, **261(5122)**: 754-6. 1993.

GALLETTI, R.; DE LORENZO, G.; FERRARI, S. "Host-derived signals activate plant innate immunity". **Plant Signaling & Behavior**, **4(1)**: 33-34. 2009.

GONZALEZ, E.; SUTTON, T. "Differentiation of isolates of *Glomerella cingulata* and *Colletotrichum* spp. associated with Glomerella leaf spot and bitter rot of apples using growth rate, response to temperature, and benomyl sensitive". **Online. Plant Health Progress**, doi:10.1094/PHP-2005-0719-01-RS pp. 1-9. 2005.

GONZALEZ, E.; SUTTON, T.B.; CORRELL, J. "Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests". **Phytopatology**, **96(9)**: 982-992. 2006.

HEATH, M.C. "Hypersensitive response-related death". **Plant Mol. Biol.**, **44**: 321-334. 2000.

HWANG, C.H.; KOLATTUKUDY, P.E. "Isolation and characterization of genes expressed uniquely during appressorium formation by *Colletotrichum gloeosporioides* conidia induced by the host surface wax". **Mol. Gen. Genet.**, **247**:282-294.

HYDE, K.; CAI, L.; CANNON, P.; CROUCH, J.; CROUS, P.; DMM, U.; GODWIN, P.H.; CHEN, H.; JOHNSTON, P.; JONES, E.; LIU, Z.; MCKENZIE, E.H.; MORINWAKI, J.; NOIREUNG, P.; PENNYCOOK, S.R.; PFENNING, L.; PRIHASTUTI, H.; SATO, T.; SHIVAS, R.; TAN, Y.P.; TAYLOR, P.W.; WEIR, B.S.; YANG, Y.L.; ZHANG, J. "*Colletotrichum* – names in current use". **Online Advances, Fungal Diversity** pp.147-182. 2009.

KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S.; BONETI, J.I. "Herança da

resistência da macieira à mancha da Gala (*Colletotrichum gloeosporioides*)”. **Fitopatologia Brasileira**, **26**: p. 409. 2001

KNUDSEN, J.T.; TOLLSTEN, L.; BERGSTROM, G. “Floral scents a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques”. **Phytochemistry**, **33**: 253-280. 1993.

KOWATA, L.S.; STRAPASSON, M.; CHALLIOL, M.A.; MIO, L.L. “Glomerella leaf spot in apple: validation of proposed diagrammatic scale and efficiency of fungicides”. **Ciência Rural**, **40(7)**: 1502-1508. 2010.

KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.; FLAISHMAN, M.A. “Surface signaling in pathogenesis”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 4080-4087. 1995.

LATUNDE-DADA, A.O.; O’CONNELL, R.J.; NASH, C.; PRING, R.J.; LUCAS, J.A.; BAILEY, J.A. “Infection process and identity of the hemibiotrophic anthracnose fungus (*Colletotrichum destructivum* O’Gara) from cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.)”. **Mycol. Res.**, **100**: 1133-1141. 1996.

LEE, S. ; SEO, J.-S. ; RODRIGUEZ-LANETTY, M. “Comparative analysis of NBS-encoding disease resistance gene analogs in cultivated and wild apple species”. **Mol. Gen. Genomics**. **269**:101-108. 2003.

LEHMANN, P. “Structure and evolution of plant disease resistance genes”. **J. Appl. Genet.** **43(4)**: 403-414. 2002.

LEITE, R.P.; TSUNETTA, M.; KISHINO, A.Y. “Ocorrência da mancha foliar da Glomerella em macieira no estado do Paraná”. **Fundação Instituto Agrônômico de Pesquisa**, **81**. 1988.

LIU, Z.M.; KOLATTUKUDY, P.E. “Identification of a gene product induced by hard-surface contact of *Colletotrichum gloeosporioides* conidia as a ubiquitin-conjugating enzyme by yeast complementation”. **J. Bacteriol.** **180**: 3592-3597. 1998.

MISHINA, T.E.; ZEIER, J. “Pathogen-associated molecular pattern

recognition rather than development of tissue necrosis contributes to bacterial induction of systemic acquired resistance in *Arabidopsis*". **Plant J.**, **50(3)**: 500-513. 2007.

MOULD, M.J.; BOLAND, G.J.; ROBB, J. "Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii-Medicago sativa* pathosystem 2. Post-penetration events". **Physiol. Mol. Plant. Pathl.** **38**: 195-210. 1991.

NAWRATH, C.; METRAUX, J-P. "Salicylic acid induction-deficient mutants of *Arabidopsis* express *PR-2* and *PR-5* and accumulate high levels of camalexin after pathogen inoculation". **Plant Cell**, **11**: 1393-1404. 1999.

NURNBERGER, T.; LIPKA, V. "Non-host resistance in plants: new insights into an old phenomenon". **Mol. Plant. Pathol.**, **6(3)**: 335-345. 2005.

PARK, S-W.; KAIMOYO, E.; KUMAR, D.; MOSHER, S.; KLESSIG, D.F. "Methyl salicylate is a critical mobile signal for plants systemic acquired resistance". **Science**, **318**: 113-116. 2007.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R., GREEN, J. "*Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions". **Fungal Genetics and Biology**, **27**: 186-198. 1999.

PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. "The formation and function of plants volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense". **Curr. Opin. Plant. Biol.**, **5**: 237-243. 2002.

PRUSKY, D.; PLUMBLEY, R.; KOBILER, I. "The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*". **Plant. Pathol.** **40**: 45-52. 1991.

RICHTER, T. ; RONALD, P. "The evolution of disease resistance genes". **Plant Molecular Biology**. **42**: 195-204. 2000.

ROCA, M.G.; DAVIDE, L.C.; MENDES-COSTA, M.C.; WHEALS, A. "Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*". **Fungal Genetics and**



**Biology**, **40**: 138-145. 2003.

ROCA, M.G.; DAVIDE, L.C.; DAVIDE, L.M.; MENDES-COSTA, M.C.; SCHWAN, R.F.; WHEALS, A.E. “Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* species”. **Mycol. Res.** **108(11)**: 1320-1326. 2004.

ROLLEMBERG, C. “Mancha das folhas da macieira: caracterização fisiológica dos agentes causais, controle biológico com bactérias residentes de filoplano e sensibilidade dos antagonistas a fungicidas e inseticidas”. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade Federal do Paraná**, pp. 1-124. 2008.

SHEN, S.; GOODWIN, P.; HSIANG, T. “Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco”. **Mycol. Res.** **105(11)**: 1340-1347. 2001.

SICILIA, F.; FERNANDEZ-RECIO, J.; CAPRARI, C.; DE LORENZO, G.; TSENOGLOU, D.; CERVONE, F.; FEDERICI, L. “The polygalacturonase-Inhibiting protein PGIP2 of *Phaseolus vulgaris* has evolved a mixed mode of inhibition of endopolygalacturonase PG1 of *Botrytis cinerea*”. **Plant. Physiol.**, **139**: 1380-1388. 2005.

STEPHENSON, S.A.; GREEN, J.R.; MANNERS, J.M.; MACLEAN, D.J. “Cloning and characterization of glutamine synthetase from *Colletotrichum gloeosporioides* and demonstration of elevated expression during pathogenesis on *Stylosanthes guianensis*”. **Curr. Genet.**, **31**: 447-454. 1997.

TAKANO, Y.; KUBO, Y.; KURODA, I.; FURUSAWA, I. “Structural analysis of PKS1, a polyketide synthase gene involved in melanin biosynthesis of *Colletotrichum lagenarium*”. **Mol. Gen. Genet.**, **249**: 162-167.

TAYLOR, J. “A necrotic leaf blotch and fruit rot of apple caused by strain of *Glomerella cingulata*”. **Phytopathology**, **61**: 221-224. 1970.

THAUNG, M.M. “Coelomycete systematics with special reference to

*Colletotrichum*". **Mycoscience**, **49**:345-350. 2008.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. "Características e controle de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira". **EMBRAPA Circular Técnica núm 25** pp. 7-16. 1999.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A.B. "manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã". **EMBRAPA Circular Técnica núm. 36** pp. 1-12. 2002.

VAN LOON, L.C. "Systemic induced resistance. Mechanism of resistance to plant diseases" (eds.) Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A., KLESSIG, D.F. "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease". **Annu. Rev. Phytopathol.**, **47**: 177-206. 2009.

WANG, K.; LI, H.; ECKER, J. R. "Ethylene biosynthesis and signaling networks". **Plant Cell**, S131-S151. 2002.

WHARTON, P.S.; JULIAN, A.M. "A cytological study of compatible and incompatible interactions between *Sorghum bicolor* and *Colletotrichum sublineolum*". **New Phytol.** **14**:25-34. 1996.

WHARTON, P.S.; DIEGUEZ-URIBEONDO, J. "The biology of *Colletotrichum acutatum*". **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, **61**(1): 3-22. 2004.

**CAPITULO II – Análises Histopatológicas do tecido foliar de  
macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Fuji e Gala, inoculado com  
*Colletotrichum gloeosporioides***

## Resumo

*C. gloeosporioides* é um patógeno fúngico capaz de causar grandes prejuízos na produção de maçã cv. Gala no sul do Brasil, tanto que várias medidas baseadas no uso de produtos químicos são recomendados para o combate preventivo deste patógeno sobre os pomares da maçã; porém os resultados dessas medidas têm sido pouco eficientes e desalentadoras, na medida em que a produção se viu em decadência em reação a anos anteriores por causa desse patógeno fúngico. O objetivo deste trabalho foi analisar o desenvolvimento do *C. gloeosporioides* sobre as folhas das cvs. Fuji (resistente ao patógeno – não desenvolve sintomas da MFG) e Gala (suscetível ao patógeno – desenvolve sintomas da MFG) até 48 horas da inoculação com o patógeno, e determinar tanto as diferenças no desenvolvimento do patógeno sobre as folhas de ambas cultivares, como as diferenças que ocorrem nos tecidos foliares de ambas cultivares, durante o desenvolvimento do patógeno sobre eles. Os tecidos foliares da cv. Gala dos distintos tratamentos reagiram diferentemente à coloração com azul de toluidina, indicando que ocorrem diferenças na histoquímica dos tecidos epidérmicos e parenquimáticos ao longo do tempo em resposta ao ataque pelo patógeno. Por sua parte, a cv. Fuji mostrou poucas diferenças na coloração com azul de toluidina ao longo do tempo, com exceção ao controle, indicando que nesta cultivar ocorrem modificações na histoquímica dos tecidos foliares desde antes das 3 horas, estendendo-se até as 48 horas após a inoculação. Por outro lado, as observações ao MEV mostraram que os conídios do *C. gloeosporioides* começaram a germinar já após 3 horas da inoculação, estendendo-se até 48 horas após a inoculação. Além disso, o patógeno apresentou certos padrões espaciais na localização de certas estruturas desenvolvidas por ele, como por exemplo, a constante localização dos apressórios nas junções celulares epidérmicas, e seu exclusivo desenvolvimento sobre a superfície adaxial do tecido foliar em ambas cultivares. Também foi detectada a ocorrência de formações de estruturas que podem ter relações com eventos de conidiação macrocíclica.

**Palavras chave:** MFG. MEV. Histoquímica. Conídios. Apressórios. adaxial.

## Abstract

*C. gloeosporioides* is a fungal pathogen capable of causing great losses in the production of apple cv. Gala in southern Brazil. Several strategies based on the use of chemicals are recommended for prevention against this pathogen on apple orchards. The results of these strategies, however, have been inefficient and disappointing to the extent that production is declining in response to previous years because of this fungal pathogen. The objective of this study was to analyze the development of *C. gloeosporioides* on leave of cvs. Fuji which is resistant to the disease, thus do not developing symptoms of GLS and Gala which is susceptible to the pathogen, thus developing symptoms of GLS until 48 hours after inoculation with the pathogen. It was also aimed at to determine differences in the development of the pathogen on the leaves of both cultivars, such as differences occurring in the leaves of both cultivars during the development of the pathogen on them. The leaf tissue of cv. Gala from different treatments reacted differently to staining with toluidine blue, indicating that were differences in the staining of the parenchyma and epidermal tissues over time in response to attack by the pathogen. On the other hand the cv. Fuji showed little differences in coloration with toluidine blue over time, except the control, indicating that in this cultivar changes occur in the staining of the leaf tissue from 3 hours before, extending until 48 hours after inoculation. On the other hand, SEM observations showed that conidia of *C. gloeosporioides* began to germinate already 3 hours after inoculation, reaching up to 48 hours after inoculation. Furthermore, some pathogen showed spatial patterns at the location of certain structures developed by him, for example, the constant location of the appressoria into epidermal cell junctions, and a unique development on the adaxial surface of the tissue in both cultivars. It was also noticed the formations of structures that may have relationships with macrocyclic conidiation events.

**Keywords:** GLS. SEM. Histochemistry. Conidia. Adaxial.

## 1- Introdução

A cultura de macieira no Brasil encontra-se sujeita ao ataque de doenças típicas de clima tropical, tais como a sarna da macieira e a Mancha Foliar da *Glomerella*. Esta doença, ocasionada pelo patógeno fúngico *C. gloeosporioides* em sua fase anamórfica (teleomórfica: *G. cingulata*) consiste atualmente em uma das doenças mais importantes da cv. Gala e de cultivares descendentes da “Golden Delicious”, e manifesta-se a partir da primavera causando altos índices de desfolhamento e reduzindo desta forma a produção quantitativa e qualitativa (Bonetti *et al*, 1999; Katsurayama, 2001). O controle desta doença esta baseada no uso de produtos químicos, que além de incrementar os custos na produção, não providenciam resultados animadores e definitivos ao combate desta doença (Araujo *et al*, 2008). Desta forma, uma das prioridades atuais dos programas de melhoramento consiste em desenvolver cultivares resistentes à MFG, as quais reduziriam o uso de agrotóxicos químicos e o impacto ambiental causado pelo seu uso (Bonetti *et al*, 2001; Costa, 2008).

A incidência da MFG é favorecida pela elevação da temperatura (acima de 20°C) e longos períodos de molhamento foliar (fornecido por elevados índices de umidade); sob estas condições, os sintomas podem tornar-se visíveis após 45 horas da infecção (Hamada, 2005). Entretanto a doença também pode estabelecer-se sob temperaturas mais baixas, como 12°C, desde que os períodos de molhamento foliar sejam suficientemente longos (Hamada, 2005). A germinação dos conídios ocorre em presença de água livre (após chuvas) ou com umidades relativas do ar próximas a 100% (Becker *et al*, 2000). No processo de infecção, o apressório adere-se à superfície do hospedeiro emitindo hifas de penetração e colonização do tecido (Menezes, 2002). Dependendo das condições ambientais ou do hospedeiro, a penetração pode não ocorrer imediatamente após a formação dos apressórios, senão que estes podem entrar num estado de quiescência até que as condições se tornem favoráveis para a penetração (Lopez, 2001).

Este capítulo objetivou analisar as diferenças a nível histológico e histoquímico entre o tecido foliar das cvs. Fuji (resistente ao *C. gloeosporioides*) e Gala (suscetível ao *C. gloeosporioides*), que ocorrem em resposta ao ataque por *C. gloeosporioides* até as 48 horas da inoculação, mediante observações ao microscópio óptico de cortes transversais do tecido foliar das cvs Fuji e Gala corados com azul de

toluidina. Este capítulo também objetivou determinar as estruturas formadas pelo *C. gloeosporioides* nas primeiras etapas da infecção, e as diferenças que apresenta no seu desenvolvimento sobre a superfície foliar de cada uma das cultivares até as 48 horas da inoculação, mediante observações ao microscópio eletrônico de varredura (MEV) das superfícies foliares das cvs. Fuji e Gala.

## **2- Material e métodos**

### **2.1- Inoculação de plantas de macieira cvs. Fuji e Gala, com o isolado SJ197 do *Colletotrichum gloeosporioides***

Vinte mudas de cada uma das cvs. Fuji e Gala, enxertadas sobre porta-enxerto M.7, foram selecionadas para inoculação com o isolado 197SJ de *C. gloeosporioides*. O inóculo foi preparado a uma concentração de  $5,0 \times 10^5$  mediante contagem dos conídios em câmara de Neubauer. As folhas das plantas foram pulverizadas em suas faces abaxial e adaxial com o auxílio de um aspersor manual e posteriormente transferidas para câmara de inoculação com temperatura e umidade controlada (25°C, 90% umidade). Finalmente, foram selecionadas ao acaso cinco plantas (repetições) por tratamento para a coleta de material (tecido foliar) a ser analisado na microscopia, totalizando 5 tratamentos (0, 3, 12, 24 e 48 h após a inoculação) incluindo o controle (plantas sem inocular – 0 h).

### **2.2- Coleta e preparação das amostras para observações ao Microscópio Óptico**

#### **2.2.1- Obtenção e Fixação das amostras**

Foram selecionadas três plantas correspondentes a cada tratamento (hora 0, 3, 12, 24 e 48) de cada cultivar, e destas, três folhas superiores (localizadas entre o primeiro e terceiro verticilo) para a obtenção de amostras destinadas às análises histopatológicas. De cada folha foram recortados entre 2-4 discos (amostras) com uma área de aproximadamente 9 mm<sup>2</sup>. As amostras foram fixadas em Solução de Fixação (2,5 % Paraformaldeído; 0,1 M Tampão Fosfato pH 7,2) durante 24 horas, a 4° C. Posteriormente, as amostras foram lavadas

duas vezes em 0,1 M de Tampão Fosfato, durante 15 minutos cada lavagem, e logo desidratadas mediante uma série de lavagens com soluções aquosas de etanol de concentrações crescente (30, 50, 70 e 100% Etanol), durante 15 minutos cada lavagem, a temperatura ambiente.

A pré-infiltração foi realizada mediante a imersão das amostras em solução de pré-infiltração (100% Etanol; Solução de Pré-infiltração do Kit de Historesina Leica®, em proporção 1:1) durante 14-16 horas, a 25° C. Posteriormente, as amostras foram imersas em solução de infiltração pura durante 24 horas a temperatura ambiente, e por último, incluídas em solução de infiltração contendo Endurecedor Leica® na proporção de 15:1 (v/v) orientadas em cápsulas gelatinosas.

### **2.2.2- Coloração das amostras com azul de toluidina**

Para observação da morfologia celular e estrutural do tecido foliar das cvs. Fuji e Gala inoculado com *C. gloeosporioides*, foram recortadas secções transversais de 7-10 µm de espessura das amostras de cada tratamento, com micrótomo de rotação SLEE Technik®. Os recortes foram distendidos sobre lâminas com uma gota de água destilada e mantidas durante 10-20 minutos a 37° C, até secarem. As lâminas contendo os cortes foram coradas por 60 segundos em solução aquosa a 0,5% de azul de toluidina e lavadas em água destilada (O'Brien *et al*, 1964). Posteriormente as lâminas foram recobertas com lamínulas e observadas ao Microscópio Óptico.

## **2.3- Coleta e preparação das amostras para observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura**

### **2.3.1- Fixação das amostras**

O procedimento para a obtenção de amostras a serem observadas ao Microscópio Eletrônico de Varredura seguiu os procedimentos descritos no item 4.2.1. Os procedimentos descritos a seguir para as observações ao MEV foram realizados de acordo a metodologia descrita por (referência). Os discos foliares foram fixados em Solução de Fixação (2,5% Glutaraldeído; 0,1 M Tampão Fosfato pH 7,2) durante 24 horas, a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas 2 vezes em 0,1 M de Tampão Fosfato, durante 15 minutos cada lavagem, e desidratadas



mediante uma série de lavagens com soluções aquosas de acetona de concentrações crescente (30, 50, 70 e 100% Acetona), durante 15 minutos cada lavagem, a temperatura ambiente.

### **2.3.2- Ponto crítico, montagem em suportes e metalização das amostras**

Após a série de lavagens em soluções aquosas de acetona, foi realizada a secagem das amostras em aparelho de ponto crítico Balzers, CPD-030; posteriormente, as mesmas foram montadas em bases metálicas (“stubs”) utilizando fita de carbono dupla face, e recobertas com duas camadas de ouro em aparelho “Íons Sputter” Balzers Unions-SCD-040. Finalmente, as observações foram realizadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM-6390LV.

## **3- Resultados e discussão**

### **3.1- Inoculações das plantas de macieira cvs. Fuji e Gala com *C. gloeosporioides***

A Figura 2 mostra as imagens das plantas da Gala e Fuji após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As Figuras 2A e 2B mostram as plantas da cv. Gala apresentando os sintomas típicos da MFG nas folhas superiores. Os sintomas aparecem como pequenas manchas de cor vermelho intenso, de poucos milímetros de diâmetro, dispersas pela folha sem apresentar regularidade, concordando com a descrição de sintomas descritos para a MFG em Valdebenito-Sanhueza et al (2002). Contudo, estes sintomas foram observados exclusivamente nas folhas superiores das plantas (do primeiro ao terceiro/quarto verticilo), sem serem detectadas nas folhas mais inferiores das plantas (quinto/sexto verticilo em diante). As Figuras 2C e 2D mostram as plantas da cv. Fuji 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides* livres de qualquer tipo de sintomas da MFG nas folhas. Estes resultados concordam com os resultados reportados por

Araujo & Stadnik (2011), nos quais não foram observados sintomas da MFG em genótipos resistentes após 48 horas da inoculação (Denardi *et al*, 2003). Não foram observados sintomas da MFG em nenhuma planta da cv. Gala (nem da cv. Fuji) em nenhum dos tempos de



**Figura 2:** **A e B** - Plantas cv. Gala após 48 horas da inoculação mostrando os sintomas típicos da MFG nas folhas superiores. Os sintomas aparecem como pequenas manchas de cor vermelho intenso dispersas pelas folhas. **C e D** – Plantas cv. Fuji após 48 horas da inoculação. Não se observam sintomas da MFG nas folhas desta cultivar.

coleta anteriores (dados não apresentados). O período de incubação do *C. gloeosporioides* nas folhas de macieira (desde a inoculação ao aparecimento de sintomas) é de 45 horas (Valdebenito-Sanhueza *et al*, 2002), o qual justifica a ausência de sintomas na cv. Gala, até as 24 horas após a inoculação. Estes resultados demonstraram que, tanto a concentração do inóculo (500.000 conídios/ml), quanto as condições nas quais as plantas foram mantidas após a aspersão do mesmo sobre elas (veja material e métodos), foram eficientes para gerar sintomas da MFG na cv. suscetível (Gala) nos tempos previstos. Por outro lado, a ausência de sintomas nas plantas da cv. Fuji após 48 horas da inoculação

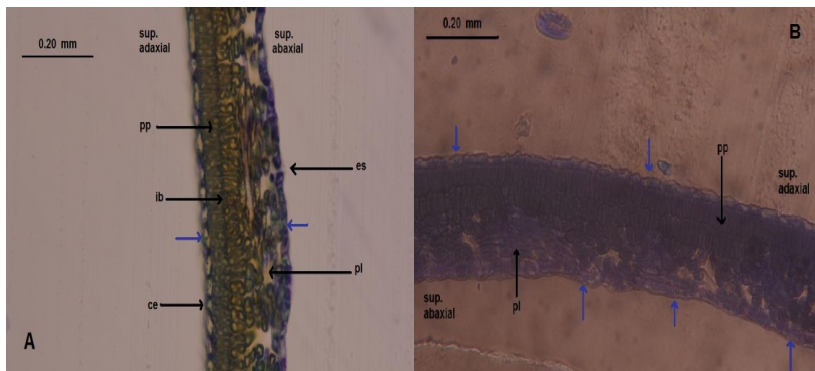
corroborou que as plantas dessa cultivar utilizadas para este trabalho, representam efetivamente um genótipo resistente à MFG (Araújo & Stadnik, 2011). Em resumo, a metodologia utilizada neste experimento mostrou-se eficiente para a coleta de amostras destinadas às microscopias ópticas e eletrônica de varredura. Isto se torna relevante uma vez que para as análises proteômicas seria suficiente apenas a presença de sintomas da MFG nas folhas da cv. Gala.

### **3.2- Observações ao Microscópio Óptico**

Foram obtidas aproximadamente 50 fotografias de corte transversal do tecido foliar (inoculado e não inoculado) da cv. Gala, e aproximadamente 80 fotografias de corte transversal de tecido foliar (inoculado e não inoculado) da cv. Fuji. Para este trabalho, foram escolhidas as fotografias que apresentassem melhor qualidade de resolução e visualização, resultantes do procedimento de coloração com azul de toluidina. Todas as amostras foram tratadas seguindo o mesmo protocolo.

A Figura 3 mostra as fotomicrografias correspondentes aos cortes transversais de tecido foliar não inoculado, das cvs. Fuji e Gala. Foi possível distinguir os tecidos parenquimáticos (paliçádico e lacunoso) e epidérmicos claramente, assim como células especializadas (idioblastos) e estômatos (Silveira, 2004). O tecido foliar de ambas cvs. apresentou uma epiderme unisseriada, isto é, constituída por uma única camada de células (Silveira, 2004). Por outro lado, o parênquima paliçádico da cv. Gala apresentou apenas uma estratificação de células isodiamétricas cilíndricas, a diferença do parênquima paliçádico da cv. Fuji o qual apresentou duas estratificações (biestratificado) de células cilíndricas bem definidas. O parênquima lacunoso também apresentou diferenças entre as cultivares: A cv. Gala apresentou um parênquima lacunoso de 3 a 4 camadas de células cilíndricas e dispostas irregularmente, enquanto que a cv. Fuji apresentou um parênquima lacunoso mais consistente e maior número de células, com menor quantidade de espaços intercelulares do que na cv. Gala (Figura 3) (Silveira, 2004).

Por outra parte, foi possível distinguir também entre ambas cultivares a presença de pequenas vesículas distribuídas internamente nos citoplasmas das células epidérmicas das superfícies abaxial e adaxial; estas vesículas reagiram com o corante resultando em uma cor

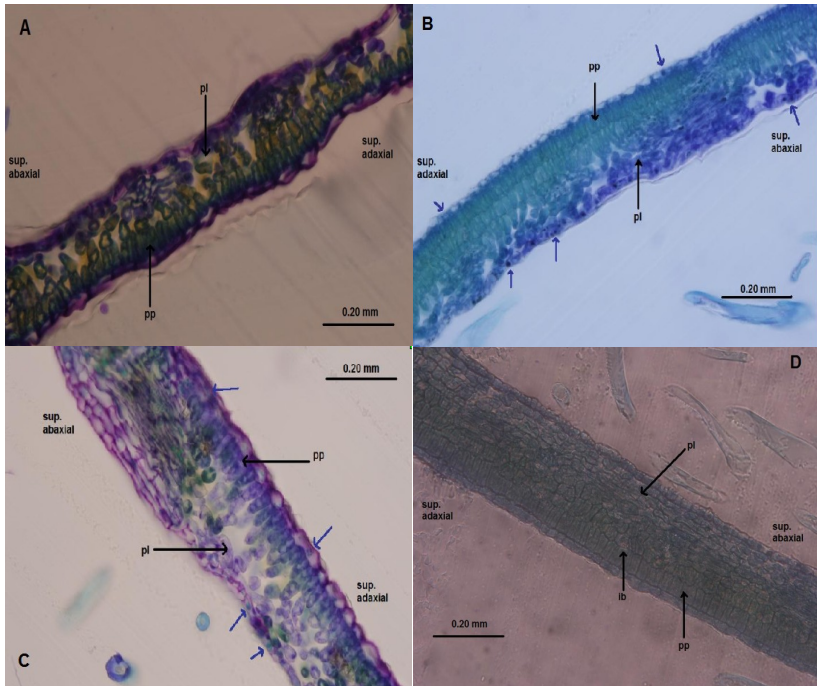


**Figura 3:** **A** -Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala, sem inoculação com *C. gloeosporioides*; **B** – Corte transversal de tecido foliar da cv. Fuji, sem inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam vesículas distribuídas internamente nas células epidérmicas que reagiram com o corante resultando numa cor azul-esverdeada. **pp**: parênquima paliçádico; **pl**: parênquima lacunoso; **es**: estômato; **ce**: célula epidérmica; **ib**: idioblasto.

azul-esverdeada, e por tanto seu conteúdos podem estar relacionados a compostos fenólicos (Figura 3) (O'Brien *et al*, 1964; Feder & O'Brien, 1968). Os compostos fenólicos possuem inúmeras funções na fisiologia vegetal, e podem servir como precursores da síntese de lignina, como tem sido observado em *Eucalyptus nitens* (Bandyopadhyay & Hamill, 2000; Taiz & Sieger, 2004)

As figuras 4A-B e 4C-D mostram os cortes transversais de tecido foliar das cvs. Gala e Fuji às 3 e 12 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*, respectivamente. Da mesma forma do que o mencionado para o tecido foliar não inoculado (Figura 3), foi possível distinguir os tecidos parenquimáticos e epidérmicos claramente, assim como as vesículas intracelulares nas células epidérmicas. Estas vesículas foram observadas em maior frequência no citoplasma das células do parênquima lacunoso e epidérmicas da superfície abaxial, em relação ao citoplasma das células epidérmicas da superfície adaxial, e adquiriram uma tonalidade azul intensa após a reação com o corante nas duas cultivares; porém, na cv. Fuji essas vesículas foram maiores e mais numerosas do que as observadas na cv. Gala (comparar as Figuras 4A e 4B).

Por outro lado, o tecido foliar da cv. Fuji apresentou em geral



**Figura 4:** **A e B** - Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 3 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente; **C e D** – Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 12 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente. As setas azuis indicam vesículas distribuídas internamente nas células epidérmicas que reagiram com o corante. **pp**: parênquima paliádico; **pl**: parênquima lacunoso; **ib**: idioblasto.

uma coloração diferente do que o tecido foliar da cv. Gala, mostrando-se mais uniforme e de coloração esverdeada. A cv. Gala apresentou mais contrastes na coloração do seu tecido, destacando-se em relação à cv. Fuji a coloração mostrada pelas células epidérmicas, as quais adquiriram uma intensa cor púrpura ao seu redor. Note-se que esta tonalidade de cor não foi observada nos cortes do tecido foliar correspondentes ao controle (comparar a figura 4A com a figura 3A). A germinação do conídio e diferenciação do tubo germinativo em apressório em espécies de *Colletotrichum*, ocorrem entre 3 e 48 horas após a deposição do conídio sobre a superfície da folha (Araújo & Stadnik, 2011;

Alexopoulos *et al*, 1996; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004). Por tanto, mesmo considerando que neste tratamento poderiam ter sido observadas estruturas que pudessem associar-se ao patógeno (conídios sem germinar, ou apenas germinando), não foram observadas estruturas de nenhum tipo relacionadas ao *C. gloeosporioides*.

De modo semelhante às 3 horas, às 12 horas após a inoculação, o tecido foliar da cv. Fuji apresentou uma coloração mais uniforme do que o tecido foliar da cv. Gala neste tratamento, com tonalidades mais esverdeadas do que purpúreas, tanto nos tecidos parenquimáticos quanto nos epidérmicos (Figura 4D). Contudo, mais uma vez foram observadas vesículas de cor azulada, distribuídas nas células epidérmicas das superfícies adaxial e abaxial, e nas células do parênquima lacunoso. Por sua parte, a cv. Gala apresentou mais uma vez vários contrastes após a coloração com azul de toluidina, acusando cores dos mais variados entre as células. No caso das células epidérmicas, estas voltaram a apresentar uma cor púrpura muito intensa, ao igual que às 3 horas após a inoculação (comparar as figuras 4A e 4C)). Nestas células, novamente foram observadas vesículas intracelulares apresentando uma cor azul intensa, tal como observado às 3 horas após a inoculação. Contudo, também foram detectadas algumas vesículas de cor azul-esverdeada (Figura 4C). Por outro lado, neste tratamento também foram observadas estruturas sobre a superfície adaxial que pelas suas características poderiam tratar-se de apressórios do *C. gloeosporioides* (Dados não apresentados). Tanto para esta espécie como para outras espécies de *Colletotrichum* (p. ex. *C. destructivum* e *C. acutatum*) os apressórios posicionam-se precisamente sobre as junções/sulcos que existem entre as células epidérmicas (Shen *et al*, 2001; Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004; Araujo & Stadnik, 2011). Para *Colletotrichum gloeosporioides* a germinação de conídios e formação de apressórios ocorre entre 3 e 48 horas da deposição do conídio sobre a superfície foliar (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004), sendo que neste caso foram observados às 12 horas após a inoculação, o qual não descarta a possibilidade de que para esse momento já exista formação de apressórios; em Araújo & Stadnik (2011) foi detectado formação de apressórios em 30% dos conídios germinados após 24 horas, e inclusive nas observações obtidas ao MEV neste trabalho, mostraram a formação de apressório após 12 horas da inoculação (veja a seguir – observações ao MEV). Finalmente, também foram observadas células que apresentaram uma coloração única e contrastante com as demais,

dispersas entre as células do parênquima paliçádico e lacunoso; estas células (idioblastos) apresentaram uma coloração marrom – avermelhada no interior do seus citoplasmas, à diferença das tonalidades purpúreas ou azul-esverdeadas das células parenquimáticas do seu redor; isto indica uma clara diferença entre a histoquímica citoplasmática de cada tipo celular, conforme o contraste das colorações resultantes da aplicação do corante (O'Brien *et al*, 1964) .

Por outro lado, as diferenças entre as colorações observadas a nível parenquimático entre as cvs. Fuji e Gala podem ser atribuídas diferentes respostas (a nível bioquímico/histoquímico) levadas a cabo por cada cultivar durante o desenvolvimento do patógeno sobre a superfície foliar. Se bem foi reportado em Araujo & Stadnik (2011) que os estágios iniciais do desenvolvimento do patógeno são semelhantes em genótipos resistentes e suscetíveis, e por tanto a resistência específica na cv. Fuji seria disparada após a colonização do fungo, não se descarta a possibilidade de que na cv. Fuji se dispare um mecanismo de defesa bioquímico mediante o reconhecimento de PAMPs, ou mesmo HAMPs (Host- Associated Molecular Patterns – Padrões Moleculares Associados ao Hospedeiro) durante a germinação e formação de apressórios (entre as 3 e 12 horas após a inoculação), antes da colonização do fungo (Gómez-gómez, 2004; Galletti *et al*, 2009). Contudo, isto merece demonstração mediante outras evidências.

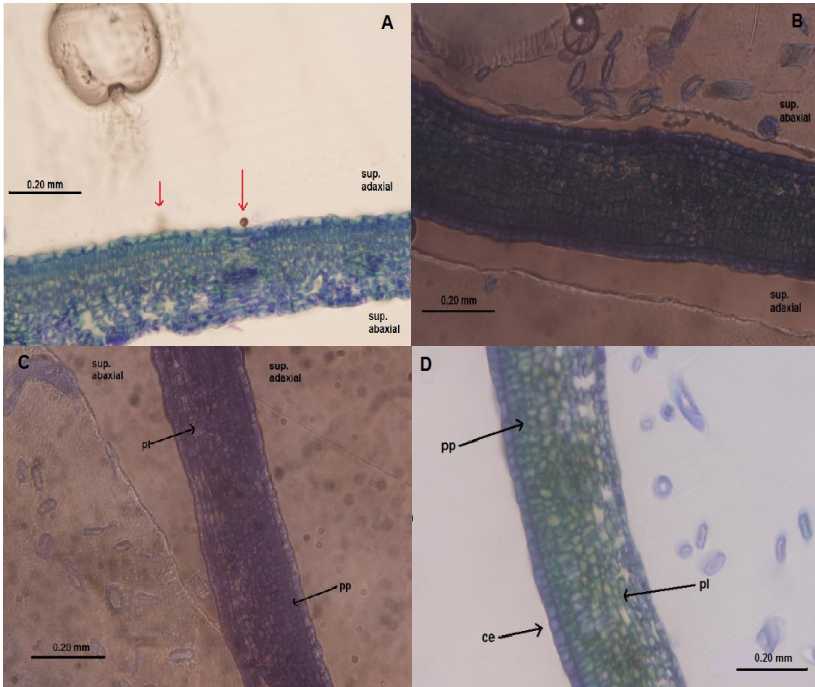
As figuras 5A-B e 5C-D mostram os cortes transversais do tecido foliar das cvs. Gala e Fuji após 24 e 48 horas da inoculação com o *C. gloeosporioides*, respectivamente. Tal como observado às 12 horas após a inoculação, às 24 horas após a inoculação também foi possível observar estruturas que podem associar-se ao patógeno pelas mesmas características descritas anteriormente, estas são, tamanho que apresentam e sua localização específica sobre o tecido foliar (Figura 5A). Shen *et al* (2001) relataram localização semelhante dos apressórios para *C. destructivum* sobre folhas de tabaco, ao igual que em Wharton & Diéguez-Uribeondo (2004) para *C. acutatum* em folhas de amendoeira. Novamente, essas estruturas apresentaram uma coloração marrom intensa após a aplicação do corante (azul de toluidina) sobre as amostras, e localizaram-se em todos os casos sobre a superfície adaxial do tecido foliar, precisamente (ou com tendência) sobre os limites existentes entre as células epidérmicas. Estes limites celulares aparecem em geral (como linhas) corado(a)s de azul ou púrpura, dependendo da presença ou não de lignificações na lamela média (Figura 5A)(O'Brien

*et al*, 1964).

Às 24 horas após a inoculação, a cv. Gala apresentou colorações do tecido foliar diferente daquelas observadas em tratamentos anteriores, em alguns casos com tonalidades mais verdes e mais uniformes, lembrando o observado para a cv. Fuji nos tratamentos anteriores (Figura 5A). Por outro lado, os tecidos parenquimáticos (paliçádico e lacunoso) da cv. Gala mostraram-se mais desenvolvidos em relação aos tratamentos anteriores (comparar a figura 5A com as figuras 3A, 4A e 4C). Neste caso, o parênquima paliçádico apresentou duas camadas (estratificações) de células cilíndricas bem marcadas, a diferença dos tratamentos anteriores, onde foram observados apenas uma camada (estratificação) de células cilíndricas por debaixo do tecido epidérmico. O parênquima lacunoso também apresentou um maior número de células com menores espaços intercelulares, em relação aos tratamentos anteriores. Mais uma vez foram observadas nesta cultivar vesículas de coloração azul intensa no citoplasma das células epidérmicas e parenquimáticas, principalmente concentradas na superfície abaxial (parênquima lacunoso – figura 5A). Contudo, também foram observadas vesículas de coloração azul intensa nas células epidérmicas da superfície adaxial. Por sua parte, a cv. Fuji mostrou novamente colorações uniformes no seu tecido foliar após o tratamento das amostras com azul de toluidina, apresentando tonalidades esverdeadas e azuis distribuídas entre os tecidos parenquimáticos e epidérmicos, respectivamente (Figura 5B). Contudo, as células epidérmicas de ambas superfícies foliares mostraram mais uma vez no interior dos seus citoplasmas a presença de vesículas de coloração azul intensa, tal como observado nos tratamentos anteriores, e na cv. Gala neste mesmo tratamento (comparar a figura 5B com as figuras 3B, 4B e 4D). Esta reação comum das vesículas intracelulares com o azul de toluidina observada nas duas cultivares, poderia indicar uma resposta a nível bioquímico comum (ou similar) entre elas, ao ataque pelo *C. gloeosporioides*.

As figuras 5C e 5D mostra os cortes transversais do tecido foliar das cvs. Gala e Fuji 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Neste tratamento, a cv. Gala apresentou a maior diferença no seu tecido foliar em relação aos tratamentos anteriores. A coloração dos tecidos parenquimáticos e epidérmicos mostrou-se uniforme, com tonalidades cor púrpura intenso, porém, os tecidos parenquimáticos se mostraram tão desenvolvidos quanto nas 24 horas





**Figura 5:** **A e B** - Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 24 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente; **C e D** – Corte transversal de tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente. As setas vermelhas na figura A indicam estruturas que podem corresponder ao patógeno. **pp**: parênquima paliçádico; **pl**: parênquima lacunoso; **ce**: célula epidérmica.

após a inoculação (Figura 5C – comparar com a figura 5A). Novamente, o parênquima paliçádico apresentou duas camadas celulares de células cilíndricas, enquanto que o parênquima lacunoso apresentou mais uma vez um maior número de células e menores espaços intercelulares (a diferença do que foi observado até as 12 horas após a inoculação – comparar a figura 5C com a figura 4C). Por sua parte, o tecido foliar da cv. Fuji mostrou-se novamente similar aos tratamentos anteriores, apresentando em geral uma distribuição uniforme na coloração, com tonalidades azuis - esverdeadas, principalmente nos tecidos parenquimáticos (Figura 5D). O tecido epidérmico das superfícies

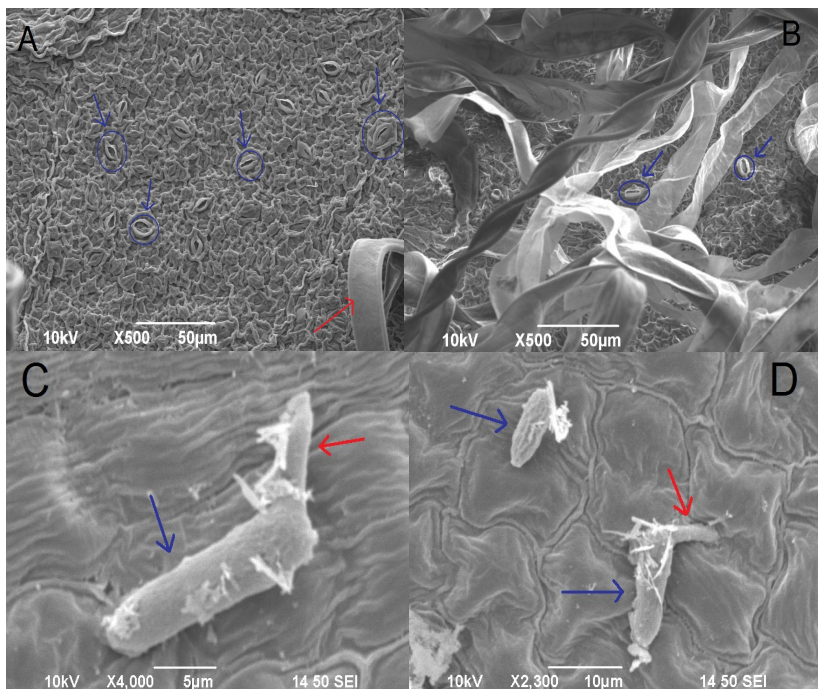
adaxial e abaxial apresentou neste tratamento uma cor azul intensa em relação aos tratamentos anteriores, distribuída de maneira mais ou menos uniforme (comparar a figura 5D com as figuras 4B, 4D e 5A). Ao contrário dos tratamentos anteriores (12 e 24 horas após a inoculação) não foram observadas estruturas que possam ter relações com o patógeno, tais como as indicadas na figura 5A. Contudo, isto não descarta de forma alguma a presença dessas estruturas sobre as superfícies adaxiais dos tecidos foliares de ambas as cultivares, uma vez que em Araujo & Stadnik (2011) reportaram uma maior taxa de germinação de conídios e formação de apressórios 48 horas após a inoculação.

De maneira geral, foi possível constatar diferenças a nível histoquímico e estrutural entre as cvs. Fuji e Gala ao longo do tempo, até as 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. A cv. Fuji, genótipo resistente, mostrou diferenças do ponto de vista histoquímico apenas entre o tecido não inoculado e o inoculado, mantendo em todos os tratamentos após a inoculação uma certa uniformidade nas colorações (resultantes da aplicação do azul de toluidina), com tonalidades azuis - esverdeadas, as quais poderiam indicar a presença de compostos fenólicos, precursores de lignina ou mesmo relacionados à defesa (O'Brien *et al*, 1964; Wharton *et al*, 2001). Importante notar que às 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides* a cv. Gala já apresenta sintomas visíveis sobre as folhas, o qual indica colonização do fungo no tecido hospedeiro. Pelo contrário, a cv. Fuji não apresenta sintomas visíveis, mas não se descarta a possibilidade de colonização no tecido hospedeiro se os mecanismos de defesa nesta cultivar são ativados durante ou mesmo após a penetração da cutícula no tecido hospedeiro, como é discutido em Araujo & Stadnik (2011). Em outras espécies de *Colletotrichum* (p. ex. *C. destructivum* e *C. sublineolum*) foi reportada a colonização no tecido hospedeiro até as 48 horas após a inoculação em genótipos suscetíveis (Wharton *et al*, 2001; Shen *et al*, 2001; Perfect *et al*, 1999). Observações ultraestruturais ao Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET) do tecido foliar da cv. Fuji poderiam revelar até que ponto ocorre a colonização do *C. gloeosporioides* no tecido foliar dessa cultivar até as 48 horas após a inoculação (Wharton *et al*, 2001; Benhamou *et al*, 2001), ou se os mecanismos de defesa são disparados previamente a colonização do patógeno.

### 3.3- Observações ao Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Foram obtidas entre 25 a 30 fotomicrografias no MEV correspondentes a cada tratamento para cada cultivar. As fotomicrografias foram obtidas a partir de dois procedimentos experimentais diferentes, sendo que cada um deles resultou em amostras a serem observadas com qualidades diferentes. O procedimento experimental que envolveu o uso do ponto crítico para a desidratação das amostras, resultou em amostras com melhores qualidades para serem observadas comparativamente aquelas que envolveram o uso de éter para a desidratação das amostras dados não apresentados). Em decorrência, neste trabalho, exceção feita às fotomicrografias correspondentes ao tratamento controle, são apresentadas unicamente as fotomicrografias que envolveram o uso de ponto crítico para a desidratação das amostras, devido à melhor qualidade de resolução e visualização que elas apresentaram.

As figuras 6A e 6B mostram fotomicrografias correspondentes à superfície abaxial do tecido foliar das cvs. Gala e Fuji 3 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*, respectivamente, enquanto que a figura 6C e 6D mostram fotomicrografias correspondentes exclusivamente à superfície adaxial da cv. Gala. Neste tratamento foram observados conídios sem germinar e germinados, os quais apresentam correspondência morfológica com os conídios sem germinar do *C. gloeosporioides* proveniente de São Joaquim/SC, observados e descritos em Hamada (2006); contudo, os conídios foram observados exclusivamente na superfície adaxial do tecido foliar (Figuras 4C-D). Foram observados conídios emitindo um incipiente tubo germinativo, sugerindo que às 3 horas após a inoculação (sob as condições nas quais foi realizado este experimento) pode já ocorrer a germinação dos conídios do *C. gloeosporioides* sobre o tecido foliar de macieira. Este fato se corresponde com os tempos de germinação de conídios para *C. gloeosporioides* da macieira (Araujo & Stadnik, 2011). A adesão dos conídios sobre o tecido hospedeiro e sua germinação é fortemente influenciada por fatores químicos e topográficos do tecido hospedeiro (Benhamou *et al*, 1991; Perfect *et al*, 1999; Mendgen *et al*, 1996). Por tanto, neste tratamento fica demonstrado, pelo fato de ter-se observado conídios em germinação, que os sinais presentes na superfície do tecido foliar das cvs. Gala e Fuji são propícios para que ocorram os primeiros



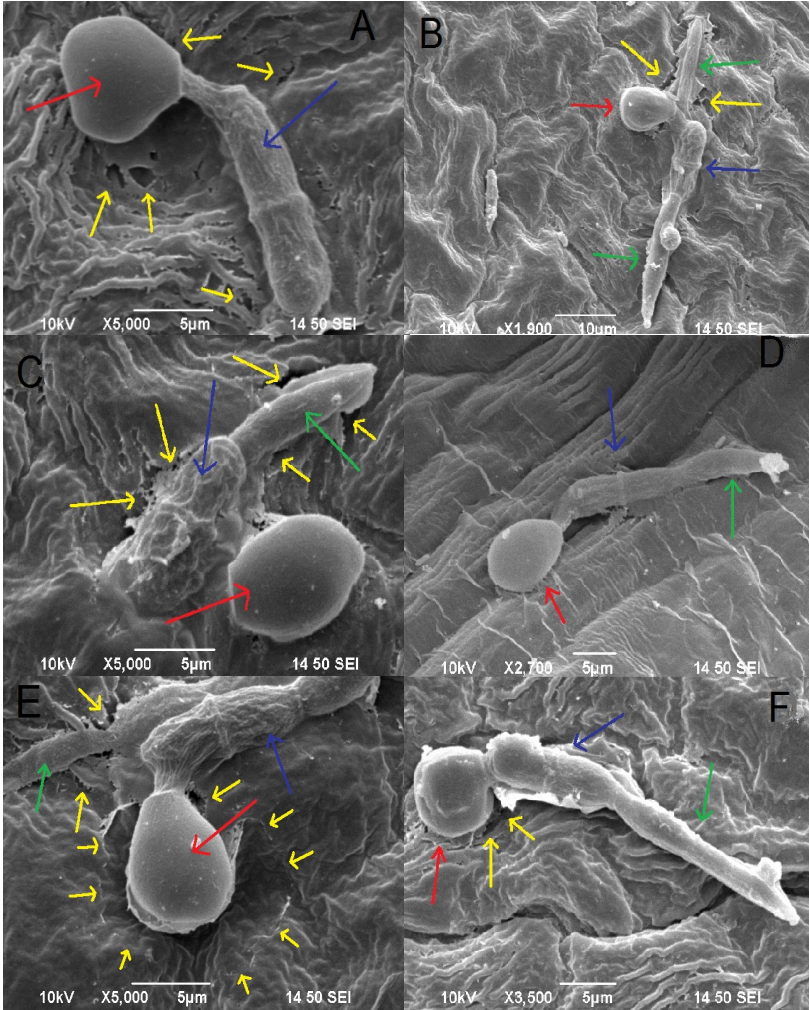
**Figura 6:** **A e B**– Superfície abaxial do tecido foliar da cv. Gala e Fuji após 3 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, respectivamente; **C e D** – Superfície adaxial da cv. Gala após 3 horas da inoculação. As setas azuis indicam o conídio, enquanto que as setas vermelhas indicam um tubo germinativo em crescimento.

estágios do desenvolvimento do *C. gloeosporioides* (Perfect *et al*, 1999).

A Figura 7 mostra fotomicrografias do tecido foliar das cvs. Gala e Fuji às 12 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Neste tratamento, tanto na cv. Gala quanto na cv. Fuji, foi possível detectar o *C. gloeosporioides* em várias fases de desenvolvimento, desde a germinação de conídios até a formação de apressórios e hifas primárias sobre a superfície adaxial do tecido foliar (Figuras 7A-F). Por outro lado, foi possível observar características comuns no desenvolvimento do patógeno (como a germinação de conídios e formação de apressórios), tanto que não foi possível diferenciar,

baseando-se no desenvolvimento do fungo, entre a cv. suscetível e a resistente. Em Araujo & Stadnik (2011) foi reportado que os eventos iniciais de penetração foram os mesmos nas cvs. Fuji e Gala, ao igual que neste trabalho; contudo, neste trabalho inclusive foi observado uma expressiva degradação do tecido (cutícula) foliar em regiões próximas ao patógeno, nas folhas das duas cultivares (Figura 7A-F). Esta degradação pode dever-se à atividade de cutinases liberadas pelo patógeno durante os processos de penetração (Bakar *et al*, 2005; Ettinger *et al*, 1987; Perfect *et al*, 1999). *C. gloeosporioides* apresentou em todos os casos o desenvolvimento de um apressório séssil próximo a um dos extremos dos conídios, enquanto que em apenas um caso mostrou a formação de um apressório distal ao conídio (Dados não apresentados). Os apressórios proximais (assim como os distais) posicionam-se sempre nos sulcos que caracterizam as fronteiras entre as células epidérmicas do tecido foliar da macieira. Por sua vez, o tecido foliar da cv. Gala apresentou uma expressiva degradação do tecido quando comparada à cv. Fuji, em regiões próximas ao patógeno (comparar as figuras 7A,7C e 7E, com as figuras 7B, 7D e 7F). Novamente, tanto a presença quanto o desenvolvimento do *C. gloeosporioides* foram detectados exclusivamente sobre a superfície adaxial do tecido foliar de ambas as cultivares, aspecto este que sugere a inexistência de associações entre as estruturas da superfície abaxial do tecido foliar e as estruturas fúngicas, que possam permitir o crescimento e colonização/infecção do patógeno a través dessa superfície.

Às 24 horas após a inoculação, *C. gloeosporioides* mostrou-se já bem desenvolvido sobre o tecido foliar de ambas as cultivares, apresentando todas as estruturas detectadas às 12 horas representando os diferentes estágios do desenvolvimento: adesão, germinação de conídios e formação de apressórios (Figuras 8A-F) (Perfect *et al*, 1999). Porém, em alguns casos foi observado neste tratamento o desenvolvimento de dois apressórios por parte do *C. gloeosporioides*, posicionando-se os dois próximos ao conídio, ou um proximal e outro distal (Figura 8A e 8F). Como nos casos anteriores, todos os apressórios foram vistos posicionados nos sulcos presentes nos limites entre as células epidérmicas, enquanto que em alguns casos algumas prolongações fúngicas (hifas primarias ou tubos germinativos) foram observadas estendendo-se sobre estes sulcos, mas em outros casos foram observadas prolongando-se por cima do tecido foliar indiferentemente das pronunciações (celulares) epidérmicas (Figura 8A-F). De todas maneiras

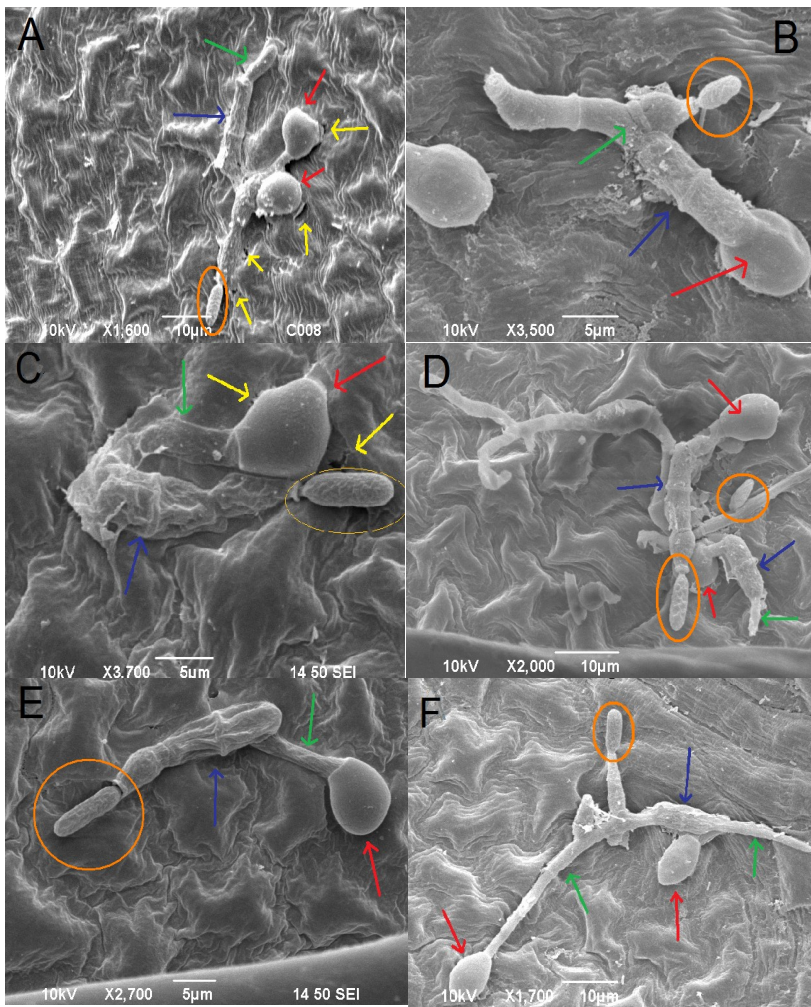


**Figura 7:** **A, C e E** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Gala após 12 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. **B, D e F** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Fuji após 12 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam os conídios germinados, enquanto que as setas vermelhas indicam os apressórios, as setas verdes indicam tubos germinativos em crescimento, e as setas amarelas indicam degradações da cutícula sobre o tecido foliar.

os estágios de desenvolvimento do patógeno dependem dos sinais químicos e topográficos da superfície foliar, de maneira que os sulcos formados nas junções celulares poderiam tratar-se de regiões favoráveis para a propagação do fungo sobre a superfície foliar (Araujo & Stadnik, 2011).

Neste tratamento foram observadas estruturas desenvolvidas a partir de ramificações do tubo germinativo que podem corresponder-se com conidióforos e conídios em formação (Figura 8A-F). Estas estruturas foram observadas tanto na cv. Fuji quanto na Gala, e os conídios associados a elas são menores em comprimento e em largura do que o conídio primário. Existem dois tipos de conidiogêneses: a) conidiação macrocíclica, onde células especializadas formam-se a partir de ramificações de tubos germinativos ou hifas primárias; b) conidiação microcíclica, onde os conídios formam-se diretamente do conídio primário, sem formar outras estruturas (Alexopoulos *et al*, 1996; Corrêa, 2007). As estruturas observadas na figura 8 (conidióforos e conídios em crescimento) apresentam como característica da conidiação macrocíclica, a ocorrência delas tanto nos extremos das hifas primárias, quanto nos extremos das ramificações destas. Finalmente, foi detectada uma expressiva degradação do tecido foliar da cv. Gala após 24 horas da inoculação, em relação à degradação detectada no tecido foliar da cv. Fuji nesse mesmo tratamento (comparar as figuras 8A, 8C e 8E, com as figuras 8B, 8D e 8F).

As 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*, foram detectadas mais uma vez diferenças nas condições dos tecidos foliares e no desenvolvimento do patógeno sobre os tecidos foliares das cvs. Fuji e Gala. Neste tratamento foi caracterizada previamente a presença exclusiva dos sintomas da MFG nas folhas superiores das plantas inoculadas da cv. Gala. Portanto, esperava-se também encontrar diferenças a nível microscópico entre os tecidos foliares destas duas cultivares. As figuras 9A-F mostram as fotomicrografias correspondentes à superfície adaxial das cvs. Gala e Fuji 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. Na cv. Fuji, o patógeno apresentou um desenvolvimento similar ao observado após 12 horas da inoculação, aparecendo em várias fases do desenvolvimento desde conídios sem germinar, até a formação de apressório (em geral proximal ao conídio) e conidiação macrocíclica (Figuras 9B, 9D e 9F). Em apenas um caso foram observados dois apressórios por conídio germinado (Dados não apresentados). Não obstante, foi observada uma expressiva

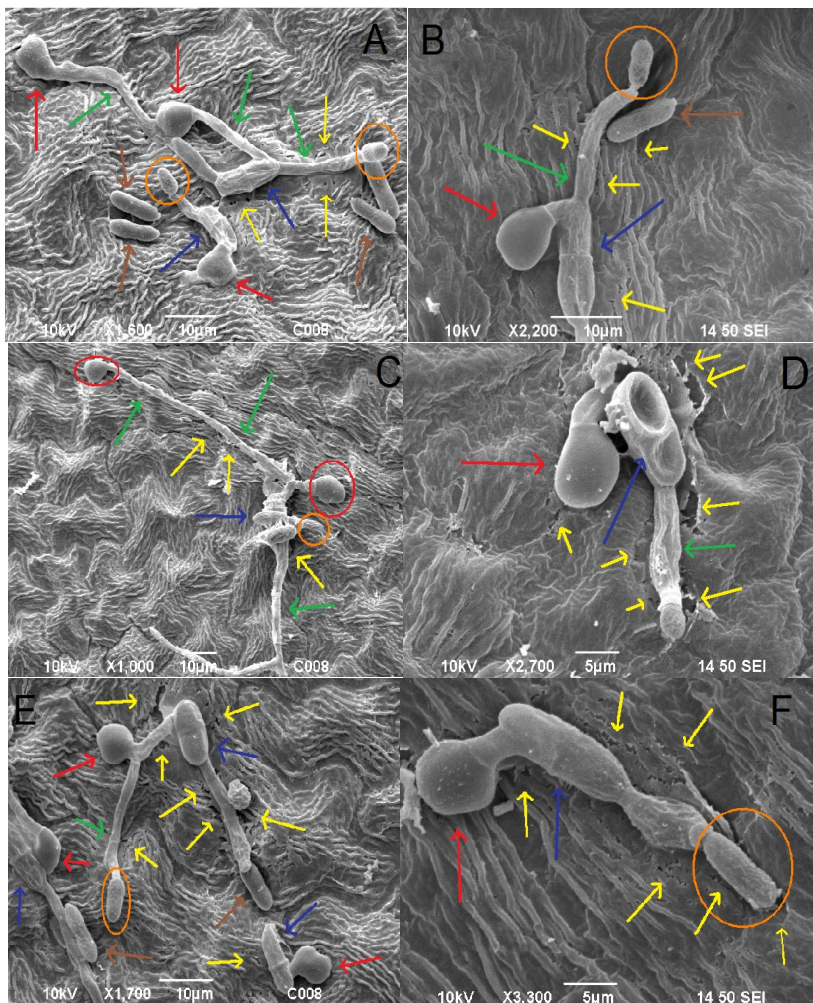


**Figura 8:** **A, C e E** – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Gala após 24 horas da inoculação com *C.gloeosporioides*. **B, D e F** - Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Fuji após 24 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam os conídios germinados, enquanto que as setas vermelhas indicam os apressórios, as setas verdes indicam os tubos germinativos em crescimento, as setas amarelas indicam degradações da cutícula sobre o tecido foliar, e os círculos laranjas indicam conídios em crescimento.



degradação do tecido foliar em regiões próximas ao assentamento do patógeno. De forma similar ao observado nos tratamentos anteriores, e correspondente para esta e outras espécies de *Colletotrichum*, os apressórios aparecem localizados nos sulcos existentes entre as células epidérmicas do tecido foliar (Araujo & Stadnik, 2011; Shen *et al*, 2001; Mendgen *et al*, 1996). O desenvolvimento do patógeno sobre o tecido foliar da cv. Gala após 48 horas da inoculação, foi diferente daquele observado na cv. Fuji (comparar as figuras 9A, 9C e 9E, com as figuras 9B, 9D e 9F). As hifas do patógeno mostraram-se mais extensas daquelas observadas na cv. Fuji, prolongando-se sobre o tecido foliar chegando a comprimentos de entre 0,05-0,1 mm de extensão conforme a escala. Mais uma vez, as hifas aparecem posicionadas tanto entre os sulcos epidérmicos como por cima destas (Figuras 9A, 9C e 9E). Também foi detectado conidiação macrocíclica (Corrêa, 2007), ao igual que às 24 horas após a inoculação (comparar as figuras 9A, 9C e 9E com as figuras 8A, 8C e 8E). Em contraste com a cv. Fuji, e próprio a este tratamento em relação aos outros da cv. Gala, foram detectados vários apressórios por conídios germinados (Figura 9A, 9C e 9F), o qual não é um fenômeno frequente no *C. gloeosporioides* da macieira (Araujo & Stadnik, 2011). Também foi observada degradação do tecido foliar nas regiões próximas ao patógeno, ao igual que nos tratamentos anteriores (a partir das 12 horas após a inoculação), o qual demonstra a presença de atividade cutinase e sinalizações favoráveis nos estágios iniciais do desenvolvimento do patógeno.

Em contraste, na cv. Gala foram observados vários conídios sem germinar e dispersos sobre a superfície adaxial do tecido foliar. Em geral, o tecido foliar da cv. Gala após 48 horas da inoculação apresentou o maior desenvolvimento do patógeno, em relação aos tratamentos anteriores, e em relação à cv. Fuji, o qual se correlaciona com a observação de sintomas somente nessa cultivar (Gala) (Valdebenito-Sanhueza, 1999, 2002). Contudo, observações ao MET ou ao microscópio confocal esclareceriam se ocorre formação de hifas de penetração na cv. Fuji, e a resistência nesse genótipo é disparada no estágio inicial no desenvolvimento da colonização, e em que estágio de colonização encontra-se o patógeno no tecido foliar da cv. Gala (Mendgen *et al*, 1996; Shen *et al*, 2001).



**Figura 9:** A, C e E – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Gala após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*; B, D e E – Superfície adaxial do tecido foliar da cv. Fuji após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*. As setas azuis indicam os conídios germinados, enquanto que as setas vermelhas indicam apressórios, as setas verdes indicam tubos germinativos em crescimento, as setas amarelas indicam degradações da cutícula sobre o tecido foliar, e os círculos laranjas indicam conídios em crescimento.

#### 4- Conclusões

As análises histopatológicas do tecido foliar de macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Fuji e Gala, inoculado com *Colletotrichum gloeosporioides* e efetuadas por microscopia ótica e MEV. Mostraram que: 1) Após três horas da inoculação alguns conídios já apresentam formação de pequenos tubos germinativos, o qual demonstra que os sinais químicos cuticulares presente na superfície adaxial do tecido foliar das cvs. Fuji e Gala são favoráveis à adesão e germinação; 2) O patógeno germina, desenvolve tubos germinativos, apressórios e pequenas hifas (primárias), em regiões topográficas específicas do tecido foliar, como os sulcos formados entre as junções celulares epidérmicas. Este fenômeno foi observado em ambas cultivares, a partir das 12 horas após a inoculação; 3) A cutícula apresenta uma expressiva degradação a partir das 12 horas após a inoculação nas duas cultivares, em regiões próximas aos assentamentos do patógeno, principalmente ao apressório e extremo do tubo germinativo (ou hifa) em crescimento, o qual se corresponde com atividade cutinase (degradação do tecido cuticular) nesse estágio do desenvolvimento (penetração subcuticular); 4) Foi detectada conidiação macrocíclica nas duas cultivares; 5) O patógeno se desenvolve exclusivamente na superfície adaxial do tecido foliar das duas cultivares, sem apresentar qualquer tipo de interação (associação) com estômatos, nem tricomas, nem qualquer tipo de estrutura presente na superfície abaxial; 6) Os tecidos parenquimáticos do tecido foliar da cv. Fuji possuem em geral maior número de estratificações (é mais robusto) em relação aos tecidos parenquimáticos da cv. Gala, o qual pode ser uma barreira natural de defesa presente na cv. Fuji. 7) A partir das 3 horas após a inoculação e durante os seguintes tratamentos, foi observado um aumento de vesículas intracelulares (que podem corresponder a compostos fenólicos) nas células epidérmicas e parenquimáticas das duas cultivares.

## REFERÊNCIAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. in Introductory Mycology. 4<sup>a</sup> ed. 1996.
- ARAUJO, L.; STADNIK, M.J. “Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*”. **Tropical Plant Pathol.**, **36(4)**: 241-248. 2011.
- ARAUJO, L.; STADNIK, M.J.; BORSATO, L.C; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. “ Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da Gala em macieira”. **Tropical Plant Pathology**, **33(2)**: 148-152. 2008.
- BAKAR, F.D.; MURAD, A.M.; HAMID, A.A.; ZAMROD, Z.; MAHADI, N.M.; SULLIVAN, P. “Induction and expression of cutinase activity during saprophytic growth of the fungal plant pathogen, *Glomerella cingulata*”. **J. Mol. Biol. Biotechnol.**, **13(2)**: 63-69.
- BANDYOPADHYAY, S.; HAMILL, J.D. “Ultrastructural studies of somatic embryos of *Eucalyptus nitens* and comparisons with zygotic embryos founds in mature seeds”. **Annals of Botany**, **86**:237-244. 2000.
- BECKER, W.F.; KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I. “Mancha foliar da Gala: principal doença de verão da cultura da macieira”. **Agropecuária Catarinense**, **13**: 14-20. 2000.
- BENHAMOU, N.; LAFITTE, C.; BARTHE, J.P.; ESQUERRE-TUGAYE, M.T. “Cell surface interactions between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum*”. **Plant Physiol.**, **97**: 234-244. 1991.
- BONETI, J.I.; RIBEIRO, L.G.; KATSURAYAMA, Y. “Manual de identificação de doenças e pragas da macieira”. **Florianópolis: EPAGRI**:48-56. 1999.
- BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. “Manejo da sarna na produção integrada da maçã”. **EMBRAPA. Circular Técnica num. 30** pp. 1-19. 2001.

CORREA, A. “*Colletotrichum acutatum*: Melanização, penetração em membranas artificiais, autofagia e mobilização de lipídeos”. **Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná**. 2007.

COSTA, C.R. “Avaliação da diversidade genética e da resistência à mancha foliar da Gala em acessos de macieira do banco de germoplasma de macieiras de EPAGRI/CAÇADOR”. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina**. pp.1-97. 2008.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M. “Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos”. **Rev. Bras. Frutic.**, **25(3)**: 494-497. 2003.

ETTINGER, W.F.; THUKRAL, S.K.; KOLATTUKUDY, P.E. “Structure of cutinase gene, cDNA, and the derived amino acid sequence from phytopathogenic fungi”. **Biochemistry**, **26**: 7883-7892. 1987.

GOMEZ-GOMEZ, L. “Plant perception systems for pathogen recognition and defense”. **Mol. Immunol.**, **41**: 1055-1062. 2004.

HAMADA, N. “Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira”. **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Recursos Genéticos Vegetais do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina**, pp. 1-106. 2006.

KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S.; BONETI, J.I. “Herança da resistência da macieira à mancha da Gala (*Colletotrichum gloeosporioides*)”. **Fitopatologia Brasileira**, **26**: p. 409. 2001.

KOLATTUKUDY, P.E.; ROGERS, L.M.; LI, D.; HWANG, C.; FLAISHMAN, M.A. “Surface signaling in pathogenesis”. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **92**: 4080-4087. 1995.

LOPEZ, A.M. “Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*”. **Revisão anual de Patologia de Plantas**, **9**:291-339. 2001.

MENDGEN, K.; HAHN, M.; DEISING, H. “Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi”. **Annual Review Phytopathol.**, **34**: 364-386. 1996.

MENEZES, M. “Aspectos biológicos e taxonômicos da espécie do gênero *Colletotrichum*”. **Fitopatologia Brasileira**, **27 (suplemento)**: S23. 2002.

O'BRIEN, T.P.; FEDER, n.; McCULLY, M.E. “Plochromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue O”. **Protoplasma**, **59**: 368-373. 1964.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R., GREEN, J. “*Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions”. **Fungal Genetics and Biology**, **27**: 186-198.1999.

SHEN, S.; GOODWIN, P.; HSIANG, T. “Hemibiotrophic infection and identity of the fungus, *Colletotrichum destructivum*, causing anthracnose of tobacco”. **Mycol. Res.** **105(11)**: 1340-1347. 2001.

SILVEIRA, F.A. “Anatomia vegetal”. Faculdade de Ciências de Curvelo/Departamento de Ciências Biológicas, pp. 1-26. 2004.

TAIZ, L.; SEIGER, E. *em* “Fisiologia Vegetal”. **4ª ed. Artmed, Porto Alegre** pp.848. 2009.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. “Características e controle de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira”. **EMBRAPA. Circular Técnica núm 25** pp. 7-16. 1999.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A.B. “manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã”. **EMBRAPA Circular Técnica núm. 36** pp. 1-12. 2002.

WHARTON, P.S.; DIEGUEZ-URIBEONDO, J. "The biology of *Colletotrichum acutatum*". **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, **61(1)**: 3-22. 2004.

WHARTON, P.S.; JULIAN, A.M.; O'CONNELL, R.J. "Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*". **Phytopathology**, **91(2)**: 149-158. 2001.





**CAPITULO III – Análises proteômicas de tecido foliar de  
macieira (*Malus domestica* Borkh.) cvs. Fuji e Gala, inoculado com  
*Colletotrichum gloeosporioides***

## Resumo

Patógenos de plantas tais como bactérias, fungos e vírus, possuem um alto potencial em causar devastações sobre inúmeros cultivos ao redor do mundo. As interações planta-patógeno tem sido estudadas mediante técnicas bioquímicas, genéticas e moleculares, e as abordagens baseadas na genômica e proteômica são fontes importantes de informação relacionadas às variações na expressão gênica e protéica em várias espécies. As técnicas proteômicas podem ser aplicadas para elucidar os processos moleculares (variação na expressão gênica e protéica) que ocorrem tanto no patógeno quanto no tecido hospedeiro, durante os estágios de reconhecimento e desenvolvimento do patógeno no tecido hospedeiro, assim como para investigar os vários processos moleculares que ocorrem durante as interações simbióticas entre as plantas e os organismos simbiontes. As análises proteômicas comparativas permitem distinguir diferenças na expressão gênica entre duas espécies ou variedades. Por outro lado, a proteômica também é utilizada em análises descritivas para elucidar modificações pós-traducionais, interatômicas e metabolômicas. Em geral, a proteômica proporciona respostas relacionadas à expressão gênica de uma célula (ou tecido) em um momento dado. Neste trabalho, a aplicação das metodologias associadas à proteômica no estudo da resistência/susceptibilidade da espécie *Malus domestica*, permitiu revelar o número de proteínas exclusivas de cada tratamento (3, 12, 24 e 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*) das cvs. Fuji e Gala. Por outra parte, foram identificadas as estruturas primárias candidatas dos peptídeos (resultantes da digestão com tripsina) das proteínas exclusivas que ocorrem depois de 24 e 48 horas da inoculação, e as principais proteínas candidatas a que esses peptídeos possam corresponder-se. Os resultados demonstraram que as cvs. Fuji e Gala expressam proteínas exclusivas diferentes após 24 e 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, e as proteínas expressadas pela cv. Fuji podem estar associadas ao disparo da resistência sistêmica adquirida (SAR).

**Palavras chave:** Proteômica. Isoeletrofocalização. Eletroforese. Peptídeo. Espectrometria de Massa.

## Abstract

Plant pathogens such as bacteria, fungi and viruses, have a high potential for causing devastations on many crops around the world. The plant-pathogen interactions have been studied by biochemical, genetic, and molecular techniques, and approaches based on genomics and proteomics are important sources of information related to changes in gene and protein expression in several species. The proteomic techniques can be applied to elucidate the molecular processes (variation in gene and protein expression) that occur in both the pathogen and the host tissue, during the stages of recognition and development of the pathogen in host tissue as well as to investigate several molecular processes that occur during the symbiotic interactions between plants and symbiotic organisms. The comparative proteomic analysis distinguishes differences in gene expression between two species or varieties. Moreover, proteomics is also used for descriptive analysis to elucidate post-translational modifications, and interatomic metabolomics. In general, proteomics provides answers related to gene expression of a cell (or tissue) at a given moment. In the present work the application of methodologies associated with the proteomic study of the resistance/susceptibility of the specie *Malus domestica*, revealed the number of unique proteins of each treatment (3, 12, 24 and 48 hours after inoculation with *Colletotrichum gloeosporioides*) of cvs. Fuji and Gala. Furthermore, it was identified the primary structures of the candidate peptides (resulting for trypsin digestion) from the unique proteins that occur after 24 and 48 hours of inoculation, and the main proteins that are candidates for these peptides to correspond. The results showed that cvs. Fuji and Gala express different and unique proteins at 24 and 48 hours after inoculation with *C. gloeosporioides*, and the proteins expressed by cv. Fuji can be associated with the launching of systemic acquired resistance (SAR).

**Keywords:** Proteomics. Isoelectric Point. Electrophoresis. Peptide. Mass Spectrometry.

## 1- Introdução

Patógenos de plantas tais como bactérias, fungos e vírus, possuem um alto potencial em causar devastações sobre inúmeros cultivos ao redor do mundo (Kav *et al*, 2007). As interações planta-patógeno tem sido estudadas mediante técnicas bioquímicas, genéticas e moleculares, e as abordagens baseadas na genômica e proteômica são fontes importantes de informação relacionadas às variações na expressão gênica e protéica em várias espécies (Kav *et al*, 2007; Padliya & Cooper, 2006). As técnicas proteômicas podem ser aplicadas para elucidar os processos moleculares (variação na expressão gênica e protéica) que ocorrem tanto no patógeno quanto no tecido hospedeiro, durante os estágios de reconhecimento e desenvolvimento do patógeno no tecido hospedeiro (Kav *et al*, 2007). Da mesma forma, a proteômica pode ser usada para investigar os vários processos moleculares que ocorrem durante as interações simbióticas entre as plantas e os organismos simbiotes. De maneira geral, os estudos baseados em técnicas proteômicas permitem a identificação de proteínas (e de genes), que podem ser utilizados para o melhoramento genético visando desenvolver por exemplo, resistência diante o ataque por parte de patógenos. A proteômica também tem demonstrado ser uma importante ferramenta em estudos destinados a esclarecer diferenças a nível molecular entre alimentos orgânicos e os derivados de plantas geneticamente modificados (Ruebelt *et al*, 2006; Jorin *et al*, 2007; Negri, 2008), assim como também na identificação de alérgenos (Petersen *et al*, 2006; Kitta *et al*, 2006). Por outro lado, também tem sido amplamente estudados os proteomas de diferentes organelas, como por exemplo cloroplastos e mitocôndrias (Pan *et al*, 2006; Jorin *et al*, 2007; Ito *et al*, 2007). Finalmente, a proteômica tem sido útil também na identificação de modificações pós-traducionais (PTMs), tais como fosforilações, glicosilações, ubiquitinações, entre outras, que podem ocorrer nas proteínas sob diferentes contextos (Mann & Jensen, 2003; Zhao *et al*, 2009).

As metodologias experimentais associadas à proteômica incluem os seguintes passos: a) extração total de proteínas de células provenientes das amostras (preparação da amostra); b) separação das proteínas totais segundo seus pontos isoelétricos (isoeletrofocalização); c) separação das proteínas segundo seu peso molecular (eletroforese); d) identificação das manchas de interesse (proteínas) nos géis; e) obtenção

dos perfis de massa dos peptídeos mediante espectrometria de massa; f) identificação da sequência aminoacídica dos peptídeos e análises de homologia de suas estruturas primárias, com as estruturas primárias das proteínas anotadas nos bancos de dados (Kersten *et al*, 2002; Graham *et al*, 2005; Chen & Harmon, 2006; Berth *et al*, 2007).

Este capítulo teve como objetivo detectar e identificar proteínas do tecido foliar de macieira cvs. Fuji e Gala inoculado com *C. gloeosporioides*, expressadas exclusivamente por cada uma das cultivares, em diferentes momentos (3, 12, 24 e 48 horas) após a inoculação com o patógeno. Assim, este trabalho teve como finalidade estudar desde um ponto de vista proteômico a interação patógeno-hospedeiro no patossistema *C.gloeosporioides* – *M. Domestica*.

## **2- Material e métodos**

### **2.1- Extração de proteínas totais de tecido foliar inoculado com *C. gloeosporioides***

Foram coletadas 3,0 gramas de tecido foliar de cada uma das 5 plantas correspondentes a 0, 3, 12, 24 e 48 horas após a inoculação (h.a.i.), de cada cultivar, destinadas às análises proteômicas. A extração de proteínas totais foi realizada a partir de 0,25 gramas de tecido foliar, proveniente das 3,0 gramas coletadas para cada planta, seguindo a metodologia proposta por Carpentier *et al* (2005). As amostras foram maceradas em cadinhos com auxílio de pistilo, após adição de nitrogênio líquido. O material macerado foi homogeneizado com 1,0 ml de Tampão de Extração de proteínas (50mM Tris-HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 100 mM KCl, 1% w/v DTT, 30% w/v sacarose, 1 mM PMSF) junto a 1,0 ml de Fenol Saturado, e colocado para agitação em vórtex durante 15 minutos. Posteriormente, o homogeneizado foi centrifugado durante 15 minutos a 15.500 g, a 4° C. A fase fenólica (superior) foi recuperada e homogeneizadas com 1,0 ml de Tampão de Extração de proteínas, mediante agitação em vórtex durante 15 minutos. Novamente o homogeneizado foi centrifugado durante 15 minutos a 15.500 g, a 4° C. A fase fenólica foi então coletada, transferida a um novo tubo contendo 100 mM acetato de amônio em Metanol na proporção 1:5 (v/v), e mantidas 12-14 horas a -20° C. Após a precipitação, o tubo foi centrifugado durante 10 minutos a 15.500 g, a 4°C. O precipitado foi

lavado com 0,5 ml de Metanol puro em 3 oportunidades consecutivas, e logo lavado com Acetona em 3 oportunidades consecutivas. Finalmente, as proteínas foram solubilizadas em 0,3 ml de Tampão de Solubilização de proteínas (7 M Uréia ; 2 M Tiouréia ; 2 mM PMSF ; 0,5% Pharmalyte® pH 3-10 ; 2% Triton X-100) mediante leve agitação em vórtex, e conservadas a -20°C.

## **2.2- Quantificação de Proteínas**

A quantificação de proteínas foi realizada seguindo o Método de Bradford (1976). As concentrações das proteínas totais extraídas foram calculadas a partir de uma curva de calibração realizada com concentrações conhecidas de BSA.

## **2.3- Preparação dos géis bidimensionais**

Para a primeira dimensão, tiras de gel de 13 cm e gradiente imobilizado de pH 3 a 10, escala linear (GE Healthcare, 17-6001-14) foram reidratados com volumes de suspensão proteica relativo a 700 µg de proteínas, homogeneizados com Tampão de reidratação (7 M Uréia ; 2 M Tiouréia ; 2% Triton X-100 ; 2% CHAPS ; 0,5% Tampão IPG pH 3-10 ; 0,002% azul de bromofenol ; 1% DTT) durante 12-14 hs a temperatura ambiente. A tira de gel após reidratada foi submetida à eletrofocalização em uma unidade Ettan-IPGPhor (GE Healthcare) a 20 °C com corrente elétrica limitada a 50 mA por tira e ajuste de voltagem de 500 V a 0.5 kWh, 1.000 V a 0.8 kWh, 8.000 V a 13.5 kWh e 8.000 V a 20 kWh (Ettan IPGphor 3: Instrument User Manual). Posteriormente, a tira de gel foi mantidas em condições redutoras durante 20 minutos em 3,0 ml de Solução de Equilíbrio/DTT (75mM Tris-HCl pH 8,8; 6M uréia ; 30% glicerol ; 125 mM DTT ; 2% SDS ; 0,002% azul de bromofenol) e em seguida, em condições alquilantes durante 20 minutos em 3,0 ml de Solução de Equilíbrio/Iodoacetamida (75mM Tris-HCl pH 8,8 ; 6M uréia ; 30% glicerol ; 125 mM Iodoacetamida ; 2% SDS ; 0,002% azul de bromofenol). Para a segunda dimensão, cada tira de gel foi transferida horizontalmente sobre a superfície de um gel de poliacrilamida a 12%, condições desnaturantes (375 mM Tris-HCl pH 8,8 ; 12% Acrilamida ; 0,32% bis-acrilamida ; 0,1% SDS ; 0,1% Persulfato de Amônio ; 0,04% TEMED) e sob gel de 0,1% agarose contendo 0,2% azul de bromofenol. A eletroforese foi realizada em cuba

SE 600 Ruby (GE Healthcare) a 4° C, contendo Tampão de Corrida ( 25 mM Tris ; 200 mM Glicina ; 0,1% SDS), aplicando-se corrente elétrica de intensidade 12,5 mA por gel durante 30 minutos, e 25 mA por gel até alcançar o final da placa. Marcadores de massa molecular com proteínas padrões entre 10 e 250 kDa (BioRad, 161-0363) foram submetidas à coeletroforese. Os géis foram revelados com azul de Coomassie (1% Blue Coomassie G-250 ; 0,1 N H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ; 0,6 M (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ; 20% metanol) durante 48 h, após incubação dos géis durante 12 h em solução de fixação (50% Metanol ; 12% Ácido Acético Glacial). Em seguida, os géis foram lavados em água destilada até retirada do excesso de corante, logo em 0,1 M Tris-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 6,5 durante três minutos, e 25% Metanol durante um minuto, e em 20% Sulfato de Amônio durante três minutos. Finalmente, os géis foram descorados com lavagem em água destilada durante 96 horas, e armazenados em 20% Sulfato de Amônio a 4° C, até digitalização (2D Electrophoresis Guide Handbook).

#### **2.4- Análises dos géis, digestão e obtenção dos perfis de massa das proteínas relevantes, e identificação das proteínas**

Os géis foram analisados por meio do software ImageMaster® 2D Platinum v 6.0, após a digitalização dos mesmos no ImageScanner® (GE Healthcare) (ImageMaster® 2D Platinum v 6.0 User Manual; ImageScanner III LabScan 6.0 user manual). A identificação e a seleção das proteínas (manchas no gel) para a resolução da estrutura primária, foram feitas através de análises comparativas dos géis correspondentes a cada tratamento, e entre os géis correspondentes a diferentes tratamentos, tanto para cada cultivar, quanto para entre cultivares. Selecionado as manchas de interesse, cada mancha foi recortada do gel manualmente e descorada mediante 3 lavagens com 0,5 ml de Solução de Descoloração (50% Acetonitrila ; 25mM de Bicarbonato de Amônio). Após a total descoloração das bandas, as mesmas foram desidratadas com 0,1 ml de 100% Acetonitrila, e colocadas durante 15 minutos em vácuo. Posteriormente, foram incorporados 20 ng de tripsina a cada banda, e mantidas 12-14 horas a 37° C. Logo a digestão, os peptídeos foram recuperados dos géis mediante 3 lavagens com 0,03 ml de Solução de Extração (50% Acetonitrila ; 5% TFA) mantendo-as em cada lavagem em agitação com vórtex durante 30 minutos. Após a extração, a solução de peptídeos foi concentrada e desidratada em Speed Vac e conservada a -20° C até a utilização no espectrômetro de massa. Para a

utilização no espectrômetro de massa, cada solução de peptídeos desidratados foi ressuspensa com 0,005 ml de 0,1% Acetonitrila, dos quais 0,001 ml foram homogeneizados com 0,001 ml de matriz (Ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico -  $\alpha$ -CCA). Deste homogeneizado, foram incorporados 0,001 ml na placa de MALDI, e mantidos sob ventilação até completa desidratação sobre a mesma. Os perfis de massa dos peptídeos foram obtidos no MALDI/TOF (Shevchenko *et al*, 1996). Finalmente, as proteínas foram identificadas a partir das listas de m/z, nos bancos de dados online Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)) e Blast ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

### **3- Resultados e discussão**

#### **3.1- Análises comparativas**

##### **3.1.1- Rendimentos da extração total de proteínas de tecido foliar de macieira cvs. Fuji e Gala**

A extração das proteínas totais do tecido foliar de macieira inoculado com patógeno mostrou diferenças em relação aos rendimentos obtidos para cada uma das cultivares. A cv. Fuji apresentou maiores rendimentos na extração de proteínas totais em todos os tratamentos em relação à cv. Gala, variando em média de 8,8 mg de proteína/grama de tecido foliar a 10,9 mg proteína/grama de tecido foliar, e 5,3 mg proteína/grama de tecido foliar e 9,1 mg proteína/grama de tecido foliar, respectivamente (Tabela 1). Estes resultados concordam com os rendimentos reportados em Carpentier *et al* (2005) para tecido foliar de banana ( $8 \pm 2$   $\mu$ g/mg), utilizando o protocolo de extração de proteínas totais baseado em fenol e precipitação em acetato de amônio, o mesmo utilizado neste trabalho.

##### **3.1.2- Comparação dos perfis proteicos do tecido foliar de macieira inoculado com *C. gloeosporioides***

A partir de cada um dos extratos de tecido foliar inoculado, correspondente a uma planta de macieira, foram calculados os volumes relativos para o carregamento com 0,7 mg de proteínas em todos os géis bidimensionais. Cada gel representa assim as proteínas totais extraídas



**Tabela 1:** Rendimentos médios (mg de proteínas totais/ g de tecido foliar) ± desvio padrão, das extrações de proteínas totais dos tecidos foliares das cvs. Fuji e Gala inoculado com *C. gloeosporioides*.

Cultivar (Tratamento)	G(0)	G(3)	G(12)	G(24)	G(48)
<b>Rendimento Médio</b> (mg proteína/g de tecido foliar)	7,5 ± 1,4	5,8 ± 2,3	6,7 ± 1,3	5,3 ± 2,1	9,1 ± 2,3

Cultivar (Tratamento)	F(0)	F(3)	F(12)	F(24)	F(48)
<b>Rendimento Médio</b> (mg proteína/g de tecido foliar)	9 ± 2,3	9,6 ± 2,8	9,8 ± 1,7	10,9 ± 1,1	8,8 ± 1,0

do tecido foliar de uma planta em particular. A Tabela 2 mostra o número de sobreposições totais das manchas detectadas dos géis de cada um dos tratamentos, para cada cultivar.

A Tabela 2 mostra o número das sobreposições detectadas (“matches”) entre as manchas totais detectadas nos géis de referência de cada tratamento, das cvs. Fuji e Gala. O critério de aceitabilidade para que cada sobreposição seja considerada como tal, é que as manchas que se correspondem a essa sobreposição, esteja presente entre o 50% e 100% dos géis utilizados nas comparações. O número de sobreposições totais na cv. Fuji ao longo do tempo foi diferente ao número de sobreposições totais detectadas na cv. Gala ao longo do tempo. Na cv. Gala, observou-se um aumento das sobreposições totais em relação ao controle após 3 horas da inoculação (305 sobreposições no controle versus 499 após 3 horas da inoculação) atingindo um máximo após 12 horas da inoculação (513 sobreposições). Após isso, observou-se um descenso nas sobreposições totais até as 48 horas após a inoculação, onde o número de sobreposições atingiu o mínimo em relação aos outros tratamento (191), número inclusive menor do que o número de

**Tabela 2:** Número das sobreposições detectadas (“matches”) entre as manchas totais detectadas em cada tratamento das cvs. Fuji e Gala, submetidas à inoculação com *C. gloeosporioides*.

Cv. (Tratamento)	F (0 h)	F (3 h)	F (12 h)	F (24 h)	F (48 h)
<b>Sobreposições Totais</b>	<b>300</b>	<b>318</b>	<b>396</b>	<b>587</b>	<b>355</b>
Cv. (Tratamento)	G (0 h)	G (3 h)	G (12 h)	G (24 h)	G (48 h)
<b>Sobreposições Totais</b>	<b>305</b>	<b>499</b>	<b>513</b>	<b>486</b>	<b>191</b>

sobreposições detectados no controle. Já na cv. Fuji, o número de sobreposições apresentou um aumento progressivo desde o controle até às 24 horas após a inoculação, onde o número de sobreposições atingiu o máximo em relação aos tratamentos anteriores (Tabela 2).

A Tabela 3 mostra o número de sobreposições exclusivas que foram detectadas em cada tratamento, quando foram comparados os grupos de géis de diferentes tratamentos, da mesma cultivar (comparações entre tratamentos). A cv. Fuji apresentou um número de sobreposições exclusivas superior ao número de sobreposições exclusivas detectadas na cv. Gala, em todos os tratamentos. Após 3 horas da inoculação a cv. Fuji apresentou um número três vezes maior de sobreposições exclusivas, em relação ao número de sobreposições exclusivas detectadas na cv. Gala para esse tratamento, enquanto que às 12 horas após a inoculação a cv. Fuji apresentou um número quatro vezes maior de sobreposições exclusivas, em relação ao número de sobreposições exclusivas detectadas pra cv. Gala para esse tratamento. Logo, embora ambas cultivares mostraram baixos números de sobreposições exclusivas detectadas em relação aos dois tratamentos anteriores (3 e 12 horas após a inoculação), após 24 e 48 horas após a inoculação ainda foram detectadas na cv. Fuji um maior número de sobreposições exclusivas em relação às sobreposições exclusivas detectadas na cv. Gala para esses dois tratamentos. Em total, para a cv. Fuji foi detectado um número três vezes maior em relação ao número de manchas exclusivas detectadas na cv. Gala (320 versus 93, respectivamente - Tabela 3).

A Tabela 4 mostra o número de sobreposições detectadas exclusivamente em cada tratamento, e exclusivamente em cada cultivar, quando foram comparados os grupos de géis de cada tratamento de cada cultivar, entre si. Neste caso a cv. Gala apresentou em todos os tratamentos um número maior de sobreposições exclusivas, em relação ao número de sobreposições exclusivas detectadas na cv. Fuji.

A Tabela 5 mostra o número de sobreposições exclusivas a cada tratamento e cultivar, simultaneamente, quando foram comparadas as listas de sobreposições exclusivas expressadas nas tabelas 3 e 4. Neste caso, o critério de aceitabilidade adotado para que esta sobreposição seja considerada como tal, é que seja uma sobreposição exclusiva ao tratamento, e exclusiva à cultivar, simultaneamente. Esta comparação (sobreposição entre duas listas de sobreposições exclusivas, uma referente ao tratamento e outra referente à cultivar) permite identificar as

**Tabela 3:** Número de sobreposições exclusivas detectadas em cada tratamento de cada cultivar, quando foram comparados os grupos de géis de diferentes tratamentos, da mesma cultivar.

Horas após inoculação	Nº Sobreposições exclusivas (GALA)	Nº Sobreposições exclusivas (FUJI)
3	37	129
12	40	162
24	10	15
48	6	14
<b>TOTAL N° Proteínas</b>	<b>93</b>	<b>320</b>

**Tabela 4:** número de sobreposições exclusivas detectadas em cada tratamento de cada cultivar, quando foram comparados os grupos de géis de cada tratamento de cada cultivar, entre si.

Tratamento	Nº Exclusivas Gala	Nº Exclusivas Fuji
3	269	46
12	398	24
24	54	43
48	106	15

proteínas que estão associadas exclusivamente aos mecanismos de resposta disparados diante o ataque pelo *C. gloeosporioides*, em cada cultivar. Neste caso, o número de sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar, foram iguais no primeiro tratamento em cada uma das cultivares (3 horas após a inoculação – 25 bandas para cada cultivar), em contraste com o segundo tratamento (12 horas após a inoculação), onde a cv Gala apresentou 29 sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar versus 5 sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar da cv. Fuji. Após 24 horas da inoculação, ambas cultivares apresentaram para este caso um pequeno número de sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar (2 na cv. Gala e 4 na cv. Fuji), e

**Tabela 5:** Número de sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar de macieira, identificadas quando foram comparadas as listas de sobreposições exclusivas expostas nas tabelas 3 e 4.

Horas após inoculação	Nº Proteínas exclusivas (GALA)	Nº Proteínas exclusivas (FUJI)
3	25	25
12	29	5
24	2	4
48	2	0
<b>TOTAL Nº Proteínas</b>	<b>58</b>	<b>34</b>

no último tratamento, após 48 horas da inoculação, não foram identificadas sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar, na cv. Fuji, enquanto que na cv. Gala foram detectadas 2 sobreposições exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar.

### **3.2- Identificação de proteínas exclusivas expressadas pelas cvs. Fuji e Gala em resposta ao ataque pelo *C. gloeosporioides***

#### **3.2.1- Espectrometria de massa e identificação de proteínas no banco de dados.**

Após a identificação e localização das sobreposições (proteínas) exclusivas a cada tratamento e cada cultivar, quando foram comparados os grupos de géis de diferentes tratamentos da mesma cultivar entre si (Tabela 3), foram recuperadas dos géis e digeridas com tripsina as proteínas correspondentes às 24 e 48 horas após a inoculação. O conjunto de peptídeos resultantes da digestão com tripsina foi analisado mediante espectrometria de massa. A partir dos perfis de massa obtidos no espectrômetro, foram identificadas as possíveis proteínas correspondentes a cada mancha recuperada nos recurso online MASCOT e PROTEIN BLAST, tomando como banco de dados as anotações de proteínas de *M.domestica* presentes no NCBIInr (sequências de proteínas não redundantes). Em primeira instância foram identificadas no MASCOT as possíveis sequências dos peptídeos que se correspondessem com os valores de m/z de cada perfil, sem tomar em

conta a quais proteínas ou a qual espécie pudessem corresponder-se;. A base de dados MASCOT gera como resultado da busca uma série de proteínas candidatas as quais possam corresponder-se os peptídeos identificados (Dados não apresentados). Logo, foi realizado um BLAST com as sequências de peptídeos de maior ranking, identificadas previamente no MASCOT, com as sequências de proteínas de *Malus domestica* Borkh. presentes no banco de dados NCBIInr. As Tabelas 6-9 mostram as proteínas candidatas exclusivamente de *Malus domestica* Borkh, correspondentes às 24 e 48 horas após a inoculação com o patógeno (veja a coluna no extremo esquerdo de cada Tabela). A base de dados apresenta várias proteínas candidatas aos quais os peptídeos identificados possam corresponder-se, porém, para cada mancha recuperada foi tabelada exclusivamente uma proteína candidata, em função dos parâmetros apresentados pelo banco de dados para cada proteína, e pela correspondência entre os pontos isoelétricos e pesos moleculares teóricos e experimentais. Os parâmetros fornecidos pelo banco de dados aparecem indicados nas tabelas como “Max score”, “Total score” “Query coverage” (correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata), o valor esperado (“E-value”), a identidade máxima (“Max Ident”, porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata), e a família (ou superfamília) de proteínas as quais elas se correspondem, baseados na presença de domínios conservados. Além disso, as Tabelas apresentam o código de identificação (“Accession”) para cada uma das proteínas candidatas.

As Figuras 10-13 mostram os géis bidimensionais do extrato de proteínas totais extraídas de tecido foliar das cvs. Fuji e Gala, após 24 e 48 horas da inoculação com o patógeno. Nas figuras aparecem as manchas totais detectadas, as manchas exclusivas de cada tratamento (círculos azuis), e as manchas exclusivas concomitantes ao tratamento e à cultivar (círculos laranjas marcadas com seu número de coordenada - “spot id” -). Note-se que na Figura 11, correspondente ao gel de referência da cv. Fuji após 48 da inoculação não existem marcadas manchas exclusivas concomitantes ao tratamento e cultivar (comparar com a Tabela 5). Por outra parte, embora tenha sido escolhidas para a identificação as proteínas exclusivas a cada tratamento, note-se também que algumas das proteínas exclusivas concomitantes ao tratamento e à

cultivar foram identificadas na base de dados de proteínas do NCBI (NCBIInr) (comparar as Tabelas 6-9 com as Figuras 9-13). Para a cv. Fuji, foram identificadas 4 proteínas concomitantes ao tratamento e cultivar, no tratamento correspondente às 24 horas da inoculação com o patógeno (comparar a Tabela 6 com a Figura 13). Para a cv. Gala, foram identificadas 2 proteínas concomitantes, para cada um dos tratamentos após 24 e 48 horas da inoculação com o *C. gloeosporioides* (comparar as Tabelas 8 e 9, com as Figuras 12 e 13, respectivamente).

Comparando as tabelas de proteínas identificadas para as cvs. Fuji e Gala após 24 e 48 horas (comparar tabelas 6 e 7 com as tabelas 8 e 9), é possível distinguir que cada cultivar responde de maneira diferente após 24 e 48 horas em resposta ao ataque pelo *C. gloeosporioides*, momentos nos quais já foi observado (neste trabalho) germinação de conídios e formação de apressório (veja capítulo 2). Na cultivar Gala o fungo já se encontra no estágio de colonização do tecido hospedeiro, a ponto de formar sintomas visíveis (veja Figura 2, Capítulo 2), concordando com as observações feitas por Wharton *et al* (2001) em *C. sublineolum* e Wharton & Dieguez-Uribeondo (2004) em *C. acutatum*, e pelo reportado em Valdebenito-Sanhueza (2002) em relação aos tempos para a aparição de sintomas da MFG na cv. Gala; pelo contrário, a cv. Fuji (genótipo resistente) não apresenta sintomas visíveis nesse tratamento, o qual indica que se encontra em decorrência de um mecanismo de resistência disparado previamente e que, a diferença da cv. Gala, lhe é capaz de evitar a colonização até o estágio necrotrófico.

No capítulo 1 discutiu-se os mecanismos pelos quais as plantas reconhecem a presença do patógeno e disparam certos mecanismo de defesa (ver Capítulo 1, 2.3 – Mecanismos de defesa em plantas). Estes mecanismos são disparados mediante o reconhecimento, por parte de receptores específicos presentes no tecido hospedeiro, de elicitores moleculares que podem ser constituintes integrais do patógeno, neste caso conhecidos como PAMPs – Padrões Moleculares Associados a Patógeno- , ou elicitores moleculares resultantes da ação enzimática sobre componentes do tecido hospedeiro por parte das proteínas extracelulares secretadas tanto pelo fungo como pela planta; neste caso, os elicitores são conhecidos como HAMPs – Padrões Moleculares associados ao hospedeiro - (Shan *et al*, 2007; Denoux *et al*, 2008; Galletti *et al*, 2009; Attaran, 2010). O reconhecimento destes PAMPs/HAMPs induzem uma série de respostas a nível molecular no tecido hospedeiro com a finalidade de prevenir a penetração e/ou

colonização do patógeno; estas variações incluem ativação de fluxos iônicos a través das membranas plasmáticas, incrementos de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a ativação de proteínas quinases, a deposição de caloses, a indução da expressão de genes relacionados à defesa, a acumulação de fitoalexinas e a produção de ácido salicílico (Attaran, 2009; Vlot *et al*, 2009; Verhagen *et al*, 2006). Neste sentido, o incremento dos níveis de ácido salicílico nos sítios próximos à infecção está diretamente relacionado com o a expressão de genes relacionados à patogenicidade (PR proteínas) e com o disparo da SAR – Resistência Sistêmica Adquirida (Taiz & Zeiger, 2004; Attaran, 2009; Vlot *et al*, 2009). Até o momento foram identificadas várias famílias de PR proteínas, e suas funções consistem em limitar o crescimento e dispersão do patógeno sobre o tecido hospedeiro (Van Loon *et al*, 2006; Attaran, 2009). Neste contexto, entre as proteínas exclusivas identificadas para a cv. Fuji após 24 e 48 horas da inoculação (tabelas 7 e 8, respectivamente) algumas parecem mostrar correspondência com proteínas expressadas durante a SAR; entre elas, após 24 horas, destacam-se: 1) desidrascorbato reductase (ABG49123.1) (mancha 359) pertencente à família das glutathione-S-transferase; proteínas pertencentes a este família são disparadas na resposta a curto prazo em resposta ao incremento nos níveis de ácido salicílico nos sítios próximos à infecção (Vlot *et al*, 2009); 2) proteína quinase dependente de cálcio (AAR28084.1) (mancha 389), estas proteínas contem um motivo de união a cálcio (EF-hand), e faz parte de uma superfamília de sensores e moduladores de sinais induzidos por cálcio. Pode estar relacionada com a regulação das variações nos níveis de cálcio intracelular disparado pelas interações entre os PAMPs e os receptores no hospedeiro (Attaran, 2009); 3) proteína quinase ativada por mitógeno (ACY82514.1) (mancha 482); este tipo de proteínas são conhecidas como MAPK, e estão envolvidas em um amplo número de respostas disparadas por estresse biótico ou abiótico (Wang *et al*, 2010); 4) proteína serina/treonina quinase (hipotética) (AEJ72565.1) (mancha 541); o gene codificante desta proteína foi identificado num locus de resistência ao fogo bacteriano em maçã (Parravicini *et al*, 2011); 5) alfa-amilase de secreção (AAX33232.1) (mancha 626); esta proteína possui um motivo de união à cálcio, e é conhecida também como 1,4-alfa-D-glucano-4-glucanohidrolase, formando parte do grupo de enzimas exoamilases; neste caso esta enzima produz unidades de glicose a partir de cadeias de amilose, amilopectina e glicogênio, e tal como reportado em Attaran

(2009), possuem semelhança com os membros da família PR-5 identificados para tabaco; 6) fator de transcrição do tipo domínio – AP2 (ADE41117.1) (mancha 949), é um fator de transcrição contendo um domínio de união a DNA encontrado nos fatores de transcrição APETALA2 e EREBP (proteína de união a elemento de resposta ao etileno); EREBP e o fator de transcrição CBF1 (com afinidade a repetidos de Citosinas), o qual está envolvido em respostas a estresses, contém uma copia do domínio AP2 (Tacken *et al*, 2010). Por tanto, este fator de transcrição identificado neste tratamento pode estar envolvido na ativação de genes de resposta ao etileno. Nenhuma destas proteínas, ou proteínas relacionadas com o disparo da SAR foram identificadas na cv. Gala, porém, foi identificada uma antocianidina sintase (AAZ79374.1) (mancha 1361), proteína que está envolvida na biossíntese de flavonoides relacionados à defesa em folhas jovens de macieira. Esta proteína foi a única que a base de dados indicou uma função diretamente relacionada com mecanismos de defesa, entre as restantes identificadas para este tratamento (24 horas da inoculação com o patógeno) na cv. Gala.

Além da antocianidina sintase expressada na cv. Gala após 24 horas, a tabela 9 mostra as outras proteínas identificadas para esse tratamento, como serem: 1) proteína (hipotética) de união a cobre (CBL94161.1) (mancha 698); estas proteínas possuem um domínio denominado de associação a metais pesados (HMA – heavy metal associated domain) encontrado em proteínas que transportam e detoxificam metais pesados. Estes domínios contêm dois resíduos de cisteínas que são importantes na união e transferência de íons metálicos, tais como cobre, cádmio, cobalto e zinco (Banci *et al*, 2001); 2) proteína da superfamília das aldeído desidrogenase (ALDH), denominada Delta(1)-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH) (ACL13549.1) (mancha 493), mitocondrial, que cataliza a conversão (dependente de NAD<sup>+</sup>) da pirrolina-5-carboxilato (P5C) a glutamato; o gene desta proteína foi identificado por ser induzido por estresse osmótico; 3) proteína (hipotética) UDP-galactose-flavonoide 3-O-galactosiltransferase (BAI44431.1) (mancha 236), proteína da família das UDP-glicosiltransferases que contêm o domínio do tipo GT1-Gtf, homólogo ao domínio encontrado nas glicosiltransferases envolvidas nos estágios finais da biossíntese de antibióticos. De maneira geral, as glicosiltransferases catalizam a transferência de um sacarídeo de um doador ativado em um receptor que pode ser de natureza sacarídeo ou



não, formando enlaces glicosídeos (Breton *et al*, 2006). Um exemplo de glicosiltransferase envolvida na SAR, são as glicosiltransferases que catalizam a reação de SAR a SAG, como forma de armazenamento do SA intracelular (Breton *et al*, 2006; Vlot *et al*, 2009); 4) Fator de transcrição relacionado ao domínio MYBR (ADL36776.1)(mancha 1360); possui uma região denominada SANT, homóloga aos domínios de união ao DNA das proteínas SWI3, ADA2, N-CoR e TFIIIB. Os repetidos em tandem deste domínio podem atuar mediante a união aos repetidos teloméricos do DNA formando parte do complexo CAP, ou também formando parte de complexos repressores da transcrição também mediante a união com o DNA (Konig *et al*, 1996); 5) proteína glicosiltransferase que cataliza a conversão floretina a floretina 2'-O-glicosídeo (florizina) (ACZ44835.1) (mancha 1298). A florizina (dihidrochalcona) é o composto fenólico mais abundante na macieira chegando a representar 14% do peso seco do tecido foliar (Gosch *et al*, 2010)

Após 48 horas da inoculação, mais uma vez a cv, Fuji apresentou proteínas relacionadas com mecanismos de defesa e possivelmente o disparo da SAR, ao igual que após 24 horas da inoculação. A tabela 7 mostra as proteínas exclusivas ao tratamento identificadas na cv. Fuji após 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, das quais podem destacar-se: 1) PR proteína (hipotética) do tipo NBS-LRR (contém domínio de união a nucleotídeo – NBS -, e domínio rico em repetidos de leucinas – LRR - ) (ABG23809.1) (mancha 1018); os autores identificaram nos primeiros 163 aminoácidos desta proteína o domínio NB-ARC, o qual esta relacionado com certos produtos de genes de resistência em plantas (van der Biezen & Jones, 1998); 2) RNAase S53 (ACM48194.1) (mancha 1279), membro da família de Ribonucleases T2 eucarióticas; este tipo de proteínas estão presentes em várias funções celulares, incluindo nas respostas à invasão por patógenos (Deshpande & Shankar, 2002). 3) proteína flavanona 3 beta-hydroxilase (AAX89397.1) (mancha 482), pertencente à família das dioxigenases, estão diretamente implicadas no metabolismo de flavonoides e atuam catalisando a conversão de dihidroflavonoides a seus respectivos flavonoides. As variações no espectro de flavonoides têm sido associadas a uma resistência potenciada frente duas doenças típicas presentes em pomares, o fogo bacteriano (ocasionado por *E. amylovora*) e a sarna da macieira (ocasionada por *V. Inaequalis*) (Halbwirth *et al*, 2006). 4) proteína de transporte transmembrana (ACZ98535.1) (mancha

562); esta proteína foi identificada como um ORF presente no locus *Rvi15* de resistência à sarna da macieira (Galli *et al*, 2010); 5) proteína tipo receptor (AEQ27741.1) (mancha 612), esta proteína possui um domínio LRR (repetido rico em leucinas) N-terminal, um domínio LRR\_RI (Leucine-Rich Repeat\_Ribonuclease Inhibitor) presente nas proteínas da superfamília LRR\_RI e um domínio de união a substrato. Este tipo de proteínas possuem diversas funções e localizações celulares. 6) Aspartato aminotransferase (BAA 92350.1) (mancha 666), é uma proteína envolvida no metabolismo de aminoácido Aspartato, pertencente à superfamília de aspartato aminotransferases (do tipo 1) dependentes de piridoxal fosfato; 7) proteína do tipo COBRA (CBL94184.1) (mancha 826); esta proteína (extracelular) ancorada a glycosyl-phosphatidyl-inositol, controla especificamente a expansão celular anisotrópica mediante seu envolvimento na orientação das microfibras de celulose (Roudier *et al*, 2002)

Após 48 horas da inoculação não foram identificadas proteínas na cv. Gala que pudessem relacionar-se diretamente com mecanismos de defesa a longo prazo (SAR) (tabela 9), o qual não descarta a possibilidade de que as proteínas identificadas possam estar envolvidas em outros mecanismo de defesa disparados por essa cultivar. Entre as proteínas identificadas estão :1) L-galactose-1-phosphate phosphatase (AAV49507.1) (mancha 755), proteínas da família das inositol monophosphatase e domínios relacionados. São fosfatases dependente de  $Mg^{2+}$ , inibidas por  $Li^{2+}$ , muitas das quais reconhecem o inositol monofosfato como substrato, desfosforilando-o para formar inositol, o qual pode ser reincorporado a lipídios inositol. Em eucariotos têm um papel vital na sinalização intracelular, e foi identificada também na biossíntese de ascorbato (Laing *et al*, 2004); 2) Aldeído desidrogenase (ALDH) família 7 (Q9ZPB7.3) (mancha 742), proteína esta que parece ser induzida por estresse osmótico, atuando como uma proteína responsiva ao turgor. Em geral, as ALDH representam uma superfamília de proteínas dependentes de NAD(P)<sup>+</sup> que oxidam um amplo espectro de aldeídos aromáticos e alifáticos exógenos, e possuem funções relacionadas à defesa em plantas, como tolerância por estresse abiótico (Kirch *et al*, 2004); 3) proteína do tipo DELLA (AAY56753.1) (mancha 410), estas proteínas são reguladores transcricionais de proteínas relacionadas ao crescimento, atuando como repressores uma vez que a giberelina é reconhecido pelo receptor GID1; as proteínas tipo DELLA reconhecem a través de seu extremo N-terminal (motivo VHYNP) a

proteína GID1 unida a giberelina, e são assim sinalizadas ao complexo molecular 26S do proteossoma para sua proteólises (Murase *et al*, 2008). Esta proteína possui além deste domínio N-terminal um domínio C-terminal do tipo GRAS, os quais estão presentes nas proteínas do tipo GRAS que são fatores de transcrição envolvidos no desenvolvimento e outros processos celulares, como transduções de iv via fitocromo A.

Tal como foi discutido acima, algumas das proteínas exclusivas identificadas para a cv. Fuji após 24 e 48 horas da inoculação com o patógeno podem estar diretamente relacionadas com a ocorrência de SAR, como por exemplo: proteína desidrascorbato reductase (ABG49123.1), proteína quinase dependente de cálcio (AAR28084.1), proteína quinase ativada por mitógeno (ACY82514.1), proteína serina/treonina quinase (hipotética) (AEJ72565.1), proteína alfa-amilase de secreção (AAX33232.1), fator de transcrição do tipo domínio – AP2 (ADE41117.1), PR proteína (hipotética) do tipo NBS-LRR, RNAase S53 (ACM48194.1), e proteína tipo receptor (AEQ27741.1) (mancha 612). Pelo contrário, na cv. Gala não foram identificadas proteínas que possam relacionar-se diretamente com a SAR, como é o caso para a cv. Fuji. Contudo, estes resultados indicariam que a diferença entre o genótipo resistente (Fuji) e o genótipo suscetível (Gala) ao *C. gloeosporioides*, reside na ativação de um mecanismo de resposta (resistência) no genótipo resistente, que está ausente, ou não é ativado, no genótipo suscetível.

#### 4- Conclusões

A partir dos resultados obtidos neste capítulo, pode concluir-se:

- 1) Os rendimentos da extração total de proteínas para cada uma das cultivares foram diferentes entre as cultivares, obtidos para a cv. Fuji rendimentos maiores do que os obtidos para a cv. Gala;
- 2) A variação no número de proteínas expressadas (sobreposições detectadas) até as 48 horas após a inoculação, foi diferente entre as cultivares Fuji e Gala;
- 3) A cv. Fuji apresentou mais proteínas exclusivas ao tratamento, em todos os tratamentos, em relação à cv. Gala;
- 4) As proteínas identificadas após 24 e 48 horas da inoculação para as cvs. Fuji e Gala, demonstram respostas diferentes por parte de cada cultivar diante o ataque pelo *C. gloeosporioides*;
- 5) A resistência na cv. Fuji pode estar relacionada ao disparo e expressão de proteínas relacionadas à SAR.

## 5- Considerações finais e perspectivas futuras

Os resultados obtidos mediante a aplicação de técnicas histopatológicas e proteômicas associadas ao estudo da resistência/suscetibilidade nas cvs. Fuji e Gala, permitiram identificar diferenças a nível estrutural e bioquímico que ocorrem até 48 horas após o ataque por *C. gloeosporioides* entre as duas cultivares, bem como identificar diferenças no desenvolvimento e formação de estruturas por parte do patógeno sobre a superfície adaxial do tecido foliar de ambas cultivares.

Desde o ponto de vista histológico e histoquímico, a cv. Fuji apresentou um tecido foliar mais robusto com maior número de células parenquimáticas, e uma reação com o corante azul de toluidina que indicaria a presença de compostos fenólicos ou lignificações a partir das 3 horas após a inoculação, até as 48 horas após a inoculação. Em contraste, o tecido foliar da cv. Gala apresentou diferentes reações com o corante azul de toluidina, segundo o tratamento. Isto indica que a cv. Fuji pode estar reconhecendo a presença do patógeno desde as fases de adesão e germinação de conídios. Este reconhecimento/percepção do patógeno vem conferido por elicitores moleculares específicos, que podem ser integrais das células do patógeno (PAMPs) ou derivados químicos resultantes da atividade enzimática de hidrolases secretadas pelo patógeno durante seu desenvolvimento (Nurnberger & Volker, 2005; Galletti *et al*, 2009).

Para que a planta hospedeira possa reconhecer esses elicitores, é necessário que a planta contenha em seu genoma os genes codificantes para os receptores capacitados para o reconhecimento dos elicitores. Estes genes são denominados “genes relacionados à patogenicidade” (*PR genes*), e codificam para proteínas relacionadas à patogenicidade (*PR proteins*) (Lehman, 2002 ; Richter & Ronald, 2000). Estas proteínas induzem uma cadeia de sinalizações intracelulares, que resultam em uma variação da expressão gênica e do metabolismo celular, com o objetivo de impedir a penetração e/ou a colonização do patógeno. Quando as células expressam PRs com alta afinidade por PAMPs e HAMPs, as sinalizações intracelulares são suficientes a ponto de desencadear um mecanismo de resistência a longo prazo e a nível sistêmico na planta conhecido como SAR (Parker *et al*, 2003; Verhagen *et al*, 2006; Denoux *et al*, 2008) . Esta resposta está caracterizada por vários fenômenos a nível local e distal ao ponto de infecção pelo

patógeno na planta, como foi já discutido nos capítulos anteriores.

Assim, este trabalho proporcionou três linhas de evidências que indicam o disparo de SAR na cv. Fuji: 1) A observação de expressiva degradação do tecido cuticular em regiões próximas às estruturas do patógeno, principalmente do apressório (que é a estrutura por onde se originam as hifas de penetração), demonstra que está havendo atividade enzimática (cutinase) e por tanto liberação de HAMPs; 2) O fungo é capaz de se desenvolver e formar estruturas próprias a este patógeno (como tubos germinativos, apressórios ou conidióforos), as quais podem ser uma fonte de PAMPs; 3) Das 28 proteínas identificadas após 24 e 48 horas da inoculação com *C. gloeosporioides*, 9 (30%) são proteínas que podem estar relacionadas com a SAR; entre essas 9, foram identificadas 2 contendo domínios LRR, entre elas uma PR, e a outra uma proteína tipo receptor. Em conjunto, a presença de PAMPs, de HAMPs, e proteínas associadas com SAR, são fortes evidências de que na cv. Fuji a resistência venha conferida mediante esse mecanismo de resposta.

Além disso, considerando que a SAR ocorre acompanhada de incrementos nos níveis de ácido salicílico (composto fenólico) em regiões proximais e distais do sítio de infecção e o fato de ter sido observado uma histoquímica característica à lignificações e/ou presença de compostos fenólicos (pelas colorações azul esverdeado resultantes da aplicação do corante azul de toluidina), isto sugere incrementos e movimentações desses compostos pelos tecidos epidérmicos e parenquimáticos da cv. Fuji. Embora a cv. Gala também tenha acusado o disparo de mecanismo de defesa/resposta ao ataque pelo *C. gloeosporioides*, estes não foram eficientes e culminaram com a presença de sintomas visíveis após 48 horas da inoculação. Esta suscetibilidade foi acompanhada pela ausência na detecção de proteínas referentes à SAR nesta cultivar.

De qualquer forma, outras estratégias bioquímicas poderiam contribuir ao esclarecimento de se a cv. Fuji dispara a SAR como mecanismo de resistência em resposta ao ataque pelo *C. gloeosporioides*. Entre estas, a análise dos níveis de ácido salicílico presentes no sítio de infecção e em porções distais da planta em relação ao sítio de infecção, e a expressão da PR-1, até 48 horas após a inoculação, seriam confirmatórias neste sentido. Análises dos níveis de outros compostos, tais como jasmonatos e etileno (Gundlach *et al*, 1992; Brader *et al*, 2001), assim como a detecção da expressão de outras PRs, também poderiam aportar evidências nesse sentido.

Em nível estrutural, a aplicação de azul de anilina seria esclarecedora em demonstrar se na cv. Fuji existe formação de calose entre as células. A aplicação de corantes específicos para lignina (p. ex. safranina) em cortes histológicos transversais (O'Brien, 1964; Villanueva-Arce, 2006), esclareceria se as tonalidades azul-esverdeadas observadas nos cortes histológicos deste trabalho se devem à presença de lignificações nos tecidos, ou de compostos fenólicos, ou de ambos. Por outro lado, observações ao microscópio fluorescente de varredura confocal aplicadas aos tecidos das cvs, Fuji e Gala até após 48 horas da inoculação, seriam capazes de revelar se existe eventos de colonização (formação de hifas secundárias necrotróficas) e degradação das paredes celulares do tecido hospedeiro, por parte do patógeno. Esta técnica permite observar em 3 dimensões o desenvolvimento do fungo sobre o tecido hospedeiro. Outra estratégia para o estudo da colonização do fungo no tecido hospedeiro, pode consistir em técnicas de microscopia ultraestrutural, baseadas em observações ao microscópio eletrônico de transmissão. Esta microscopia fornece uma resolução a nível intracelular, capaz de esclarecer a presença de engrossamentos da parede celular, a formação de papilas e caloses, e a presença, tamanho e natureza química de vacúolos intracelulares (Wharton *et al*, 2001), em cada uma das cultivares. Finalmente, metodologias baseadas na RT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real) permitiriam revelar tanto a presença, quanto o nível de expressão de RNAm específicos à SAR (Anand *et al*, 2008) em ambas cultivares. Esta metodologia não só confirmaria os resultados obtidos neste trabalho, senão que também os complementaria com informação relacionada a níveis de transcrição, e possíveis regulações pós-transcricionais ou mesmo, traducionais.

## REFERÊNCIAS

- AMERSHAM BIOSCIENCES in “2D-Electrophoresis: Principles and Methods”. (2005) **80-6429-60 AC**. Amersham Place, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK.
- AMERSHAM BIOSCIENCES in “ImageMaster 2D Platinum 6.0: User Manual”. (2005) **11-0034-38 AA**. Amersham Biosciences AB, Bjorkgatan 30, 751 84 Uppsala, Sweden.
- ANAND, A.; UPPALAPATI, S.R.; RYU, C-M.; ALLEN, S.N.; KANG, L.; TANG, Y.; MYSORE, K.S. “Salicylic acid and sistemic acquired resistance play a role in attenuating crown gall disease caused by *Agrobacterium tumefaciens*”. **Plant Physiol.**, **146**: 703-715. 2008.
- ATTARAN, E. “Regulation of pathogen-inducible volatile compounds in *Arabidopsis* and their role in plant defense”. **Tese de doutorado apresentada à Universidade Julius-Maximilians/Wurzburg**. pp. 1-116. 2010.
- BANCI, L.; BERTINI, I.; CONTE, R.D.; MARKEY, J.; RUIZ-DUENAS, F.J. “Copper trafficking: the solution structure of *Bacillus subtilis* CopZ”. **Biochemistry**, **40**: 15660-15668. 2001.
- BERTH, M.; MOSER, F.M.; KOLBE, M.; BERNHARDT, J. “The state of the art in the analysis of two-dimensional gel electrophoresis images”. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, **76**: 1223-1243. 2007.
- BRADER, G.; TAS, E.; PALVA, T. “Jasmonate-dependent induction of indole glucosinolates in *Arabidopsis* by culture filtrates of the nonspecific pathogen *Erwinia carotovora*”. **Plant Physiol.**, **126**:849-860. 2001.
- BRADFORD, M.M.A. “A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding”. **Analytical Biochem.**, **72**: 248-254. 1976.
- BRETON, C.; SNAJDROVA, L.; JEANNEAU, C.; KOCA, J.; IMBERTY, A. “Structures and mechanisms of glycosyltransferases”.



**Glycobiology**, **16(2)**: 29R-37R. 2006.

CARPENTIER, S.C.; WITTERS, E.; LAUKENS, K.; DECKERS, P.; SWENNEM, R.; PANIS, B. "Preparation of protein extracts from recalcitrant plant tissues: An evaluation of different methods for two-dimensional gel electrophoresis analysis". **Proteomics**, **5**: 2497-2507. 2005.

CHEN, S.; HARMON, A.C. "Advances in plant proteomics". **Proteomics**, **6**: 5504-5516. 2006.

DENOUX, C.; GALLETTI, R.; MAMMARELLA, N.; GOPALAN, S.; WERCK, G.; DE LORENZO, G.; FERRARI, S.; AUSUBEL, F.M., DEWDNEY, J. "Activation of defense response pathways by OGs and flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings". **Mol. Plant**, **1**: 423-425. 2008.

DESPHANDE, R.A.; SHANKAR, V. "Ribonucleases from T2 family". **Crit. Rev. Microbiol.**, **28(2)**: 79-122. 2002.

GALLETTI, R.; DE LORENZO, G.; FERRARI, S. "Host-derived signals activate plant innate immunity". **Plant Signaling & Behavior**, **4(1)**: 33-34. 2009.

GALLI, P.; BROGGINI, G.A.; KELLERHALS, M.; GESSLER, C.; PATOCCHI, A. "High-resolution genetic map of the *Rvi15* (*Vr2*) apple scab resistance locus". **Mol. Breed.** **26**: 561-572. 2010.

GE HEALTHCARE in "ImageScanner III LabScan 6.0: User Manual". (2009) **28-9173-83 AB 03**. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, 751 84 Uppsala, Sweden.

GE HEALTHCARE in "IPGphor 3: Instrument User Manual". (2005) **11-0034-58 AB**. GE Healthcare Bio-Sciences AB, Björkgatan 30, 751 84 Uppsala, Sweden.

GOSCH, C.; HALBWIRTH, H.; SCHNEIDER, B.; HOLSCHER, D.; STICH, K. "Cloning and heterologous expression of glycosyltransferases from *Malus domestica* and *Pyrus communis*, which convert phloretin to phloretin 2'-O-glucoside (phloridzin)". **Plant Science**, **178(3)**: 299-306. 2010.

- GRAHAM, D.R.M.; ELLIOTT, S.T.; VAN EYK, J.E. "Broad-based proteomic strategies: a practical guide to proteomics and functional screening". **J. Physiol.**, **563.1**: 1-9. 2005.
- GUNDLACH, H.; MULLER, M.J.; KUTCHAN, T.N.; ZENK, M.H. "Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures". **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, **89**: 2389-2393. 1992.
- HALBWIRTH, H.; FISCHER, T.C.; SCHLANGEN, K.; RADEMACHER, W.; SCHLEIFER, K-J.; FORKMANN, G.; STICH, K. "Screening for inhibitors of 2-oxoglutarate-dependent dioxygenases: Flavonone 3 beta-hydroxylase and flavonol synthase". **Plant Science**, **171(2)**: 194-205. 2006.
- ITO, J.; HEAZLEWOOD, J.L.; MILLAR, A.H. "The plant mitochondrial proteome and the challenge of defining the post-translational modifications responsible for signalling and stress effects on respiratory functions". **Physiol. Plantarum**, **129**: 207-224. 2007.
- JORRIN, J.J.; MALDONADO, A.M.; CASTILLEJO, M.A. "Plant proteome analysis: A 2006 update". **Proteomics**, **7**: 2947-2962. 2007.
- KAV, N.; SRIVASTAVA, S.; YAJIMA, W.; SHARMA, N. "Application of proteomics to investigate plant-microbe interaction". **Current Proteomics**, **4**: 28-43. 2007.
- KERSTEN, B.; BURKLE, L.; KUHN, E.J.; GIAVALISCO, P.; KONTHUR, Z.; LUEKING, A.; WALTER, G.; EICKHOFF, H.; SCHNEIDER, U. "Large-Scale plant proteomics". **Plant Mol. Biol.**, **42**: 133-141. 2002.
- KIRCH, H.H.; BARTELS, D.; WEI, Y.; SCHNABLE, P.S.; WOOD, A.J. "The ALDH gene superfamily of *Arabidopsis*". **Trends Plant. Sci.**, **9**: 371-377. 2004.
- KITTA, K.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; MORIYAMA, T.; OGAWA, T.; KAWAMOTO, S. "Detection of low-molecular weight allergens resolved on two-dimensional electrophoresis with acid-urea

- polyacrylamide gel". **Anal Biochem.**, **351(2)**: 290-297. 2006.
- KONIG, P.; GIRALDO, R.; CHAPMAN, L.; RHODES, D. "The crystal structure of the DNA-binding domain of yeast RAP1 in complex with telomeric DNA". **Cell**, **85**: 125-136. 1996.
- LAING, W.A.; BULLEY, S.; WRIGHT, M.; COONEY, J.; JENSEN, D.; BARRACLOUGH, D.; MACRAE, E. "A highly specific L-galactose-1-phosphate phosphatase on the path to ascorbate biosynthesis". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **101(48)**: 16976-81. 2004.
- LEHMANN, P. "Structure and evolution of plant disease resistance genes". **J. Appl. Genet.** **43(4)**: 403-414. 2002.
- MANN, M.; JENSEN, O.N. "Proteomic analysis of post-translational modifications". **Nature Biotechnol.**, **21**: 255-261. 2003.
- MURASE, K.; HIRANO, Y.; SUN, T-P.; HAKOSHIMA, T. "Gibberellin-induced DELLA recognition by the gibberellin receptor *GID1*". **Nature**, **456(7221)**: 459-463. 2008.
- NEGRI, A. ; PRINSI, B. ; ROSSONI, M. ; FAILLA, O. ; SCIENZA, A. ; COCUCCHI, M. ; ESPEN, L. "Proteome changes in the skin of the grape cultivar Barbera among different stages of ripening". **BMC genomics.** **9(378)**: 1-19. 2008.
- PADLIYA, N.D.; COOPER, B. "Mass spectrometry-based proteomics for the detection of plants pathogens". **Proteomics**, **6**: 4069-4075. 2006.
- PAN, S.Q.; CARTER, C.J.; RAIKHEL, N.V. "Understanding protein trafficking in plant cells through proteomics". **Expert Rev. Proteomics**, **2**: 781-792. 2006.
- PARKER, J.E. "Plant recognition of microbial patterns". **Trends plant. Sci.**, **8**: 245-247. 2003.
- PARRAVICINI, G.; GESSLER, C.; DENANCE, C.; LASSERRE, P.; VERGNE-GAILLARD, E.; BRISSET, M.N.; PATOCCHI, A.; DEREL, C.E.; BROGGINI, G.A. "Identification of serine/threonine kinase and

nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in the fire blight resistance quantitative trait locus of apple cultivar 'Evereste'". **Mol. Plant Pathol.**, **12 (5)**: 493-505. 2011.

PETERSEN, A.; DRESSELHAUS, T.; GROBE, K.; BECKER, W.M. "Proteome analysis of maize pollen for allergy-relevant components". **Proteomics**, **6**: 6317-6325. 2006.

RICHTER, T. ; RONALD, P. "The evolution of disease resistance genes". **Plant Molecular Biology**. **42**: 195-204. 2000.

ROUDIER, F.; SCHINDELMAN, G.; DESALLE, R.; BENFEY, P.N. "The COBRA family of putative GPI-anchored proteins in *Arabidopsis*. A new fellowship in expansion". **Plant Physiol.**, **130(2)**: 538-548. 2002.

RUEBELT, M.C.; LEIMGRUBER, N.K.; LIPP, M.; REYNOLDS, T.L.; ASTWOOD, J.D.; ENGEL, K-H.; JANY, K-D. "Application of two-dimensional gel electrophoresis to interrogate alterations in the proteome of genetically modified crops. 1. Assessing analytical validation". **J. Agric. Food chem.**, **54(6)**: 2154-2161. 2006.

SHEVCHENKO, A.; WILM, M.; VORM, O.; MANN, M. "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels". **Analytical Chemistry**, **68(5)**: 850-858. 1996.

TACKEN, E.; IRELAND, H.; GUNASEELAN, K.; KARUNAIRETMAN, S.; WANG, D.; SCHULTZ, K.; BOWEN, J.; ATKINSON, R.G.; JOHNSTON, J.W.; PUTTERILL, J.; HELLENS, R.P.; SCHEFFER, R.J. "The role of ethylene and cold temperature and cold temperature in the regulation of the apple POLYGALACTURONASE 1 gene and fruit softening". **Plant Physiol.**, **153(1)**: 294-305. 2010.

TAIZ, L.; SEIGER, E. *en Fisiologia Vegetal*. 4ª ed. Artmed, Porto Alegre pp.848. 2009.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A.B. "manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã". **EMBRAPA Circular Técnica**

núm. 36 pp. 1-12. 2002.

VAN DER BIEZEN, E.A.; JONES, J.D. "The NB-ARC domain: a novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals". **Curr. Biol.**, **8(7)**: R226-7. 1998.

VAN LOON, L.C.; REP, M.; PIETERSE, C.M.J. "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants". **Annu. Rev. Phytopathol.**, **44**: 135-62. 2006.

VERHAGEN, W.M.; VAN LOON, L.C.; PIETERSE, C.M.J. "Induced disease resistance signaling in plants". *Flor. Orn. Plant Biotech.*, **3**: 334-343. 2006.

VILLANUEVA-ARCE, R.; SORIANO, E.; HERNANDEZ, A.M.; AGUILERA, A.M.; TELIZ, D. "Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya". **Agrociencia**, **40(006)**: 773-782. 2006.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. "Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease". **Annu. Rev. Phytopathol.**, **47**: 177-206. 2009.

WANG, X.J.; ZHU, S.Y.; LU, Y.F.; ZHAO, R.; XIN, Q.; WANG, X.F.; ZHANG, D.P. "Two coupled component of the mitogen-activated protein kinase cascade MdMPK1 and MdMKK1 from apple function in ABA signal transduction". **Plant Cell Physiol.**, **51(5)**: 754-766. 2010.

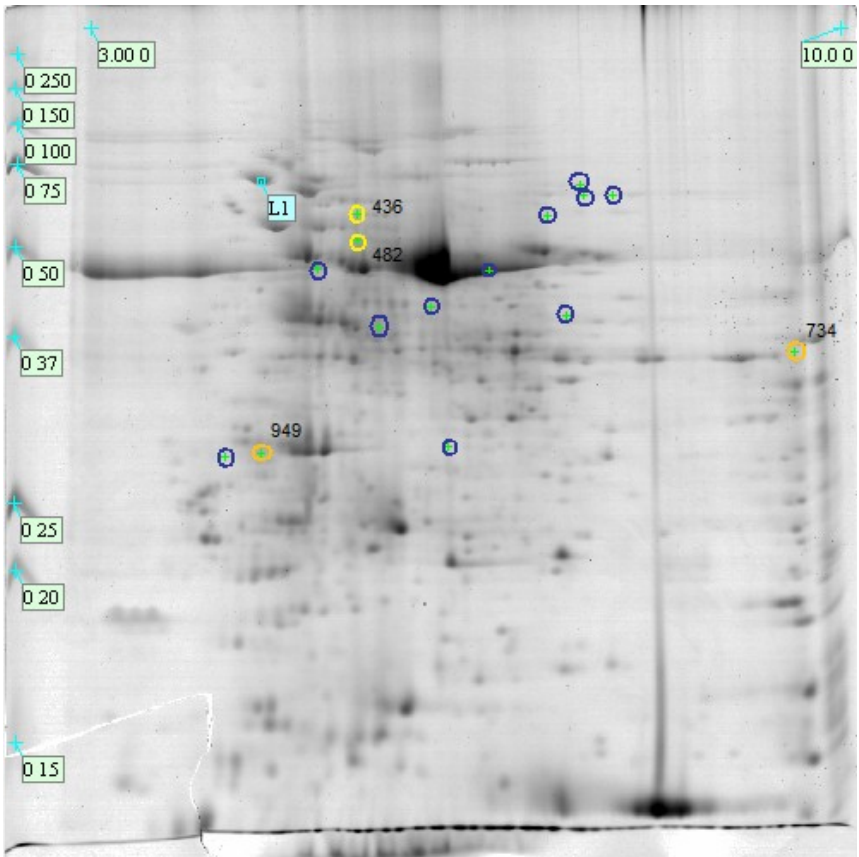
WHARTON, P.S.; DIEGUEZ-URIBEONDO, J. "The biology of *Colletotrichum acutatum*". **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, **61(1)**: 3-22. 2004.

WHARTON, P.S.; JULIAN, A.M.; O'CONNELL, R.J. "Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*". **Phytopathology**, **91(2)**: 149-158. 2001.

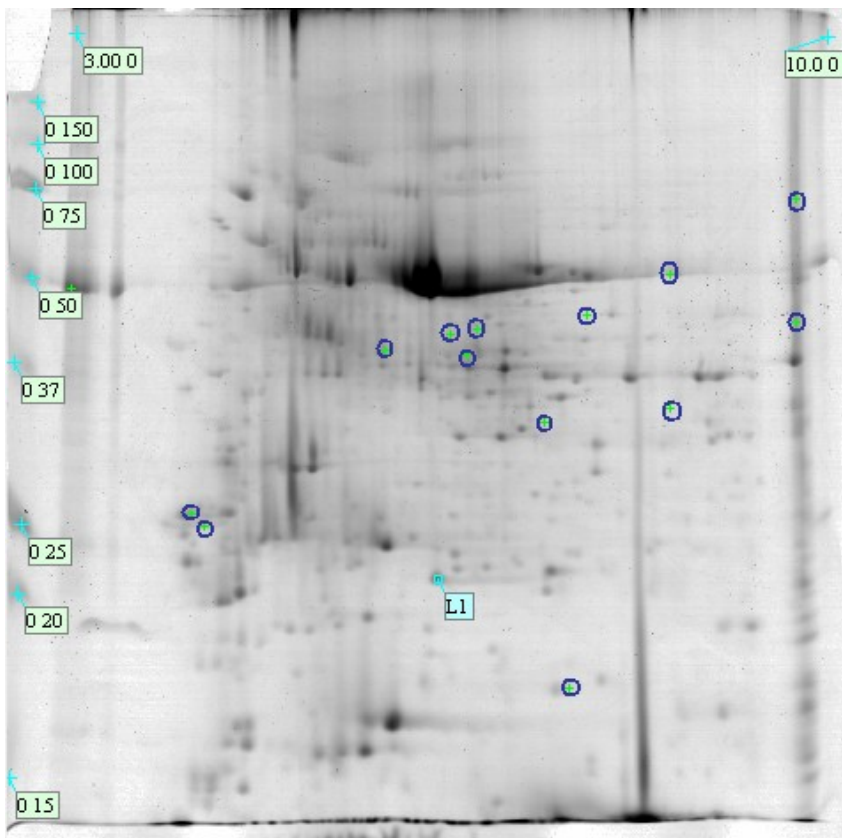
ZHAO, Y.; JENSEN, O.N. "Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques". **Proteomics**, **9(20)**: 4632-4641. 2009.



## APÊNDICE

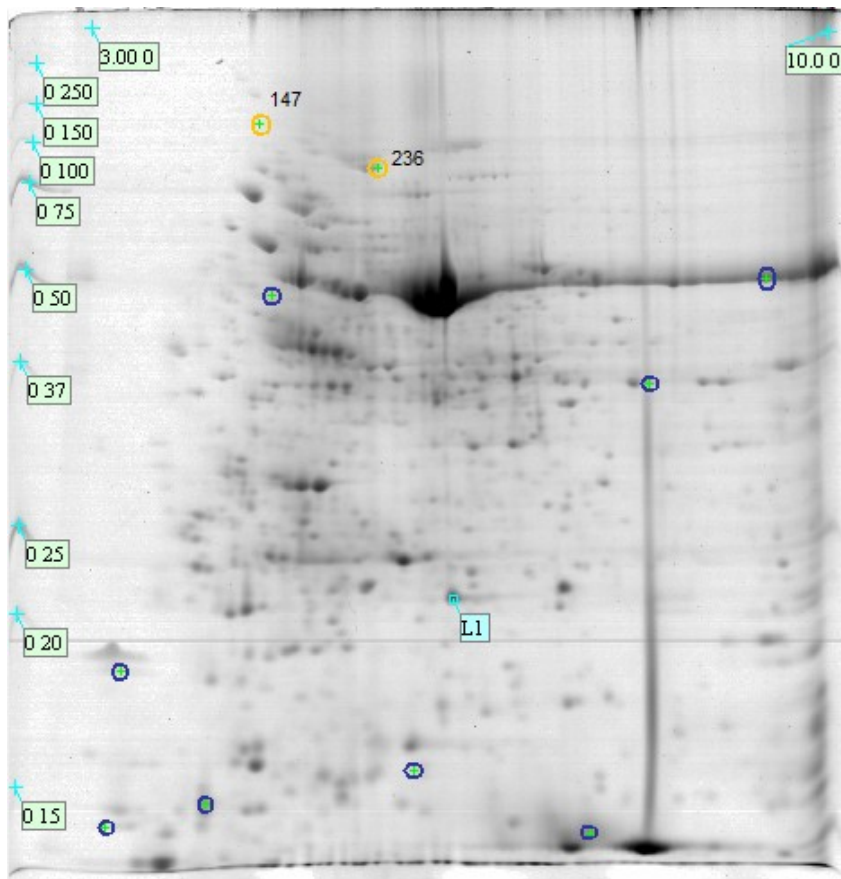


**Figura 10:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Fuji, extraídas às 24 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Fuji (ver Tabela 3); os círculos cor laranja (marcados com o número identificador da mancha - “spot ID”) indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.

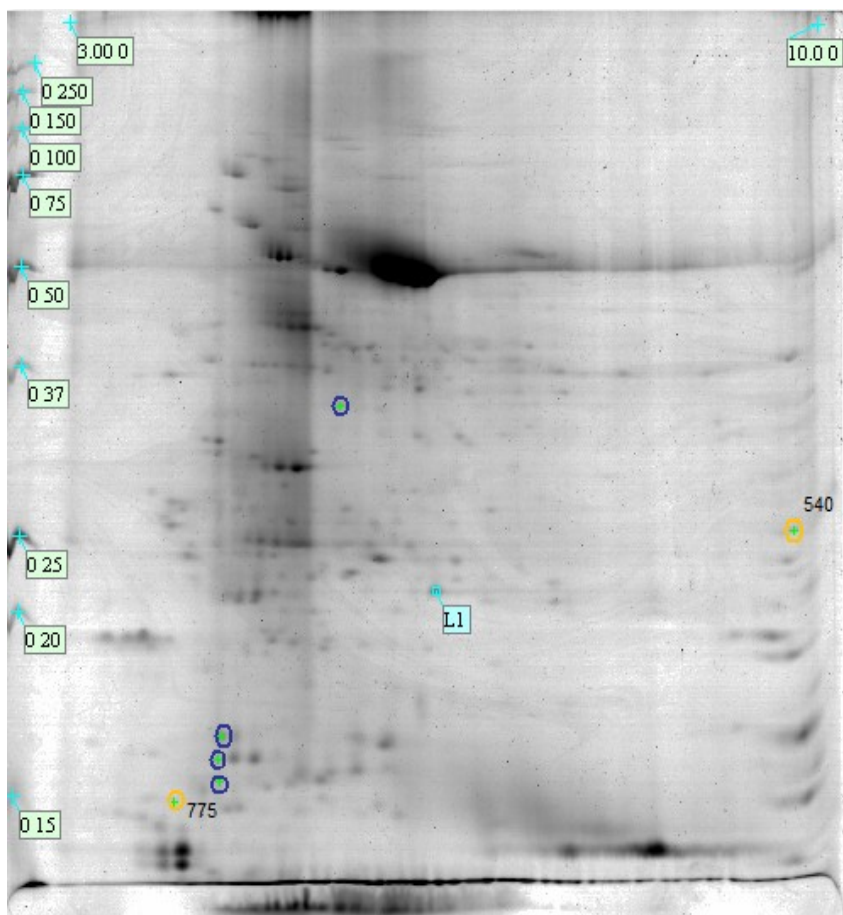


**Figura 11:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Fuji, extraídas às 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Fuji (ver Tabela 3); não foram detectadas sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.





**Figura 12:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Gala, extraídas às 24 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Gala (ver Tabela 4); os círculos cor laranja (marcados com o número identificador da mancha - “spot ID”) indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévios às comparações.



**Figura 13:** Gel de referência bidimensional das proteínas totais do tecido foliar da cv. Gala, extraídas às 48 horas após a inoculação com *C. gloeosporioides*. Os círculos azuis indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, detectadas quando comparados os géis dos tratamentos da cv. Gala (ver Tabela 4); os círculos cor laranja (marcados com o número identificador da mancha - “spot ID”) indicam as sobreposições exclusivas ao tratamento, e à cultivar, concomitantemente (ver Tabela 5). A marca L1 que aparece anotada sobre o gel, indica uma mancha usada como referência para alinhar os géis prévio às comparações.

**Tabela 6:** Proteínas identificadas da cv. Fuji, expressadas exclusivamente às 24 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. **Acesso:** código de identificação das proteínas (número de acesso; **Query coverage:** correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; **E-value:** Valor esperado; **Max Ident:** porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. **PI exp:** Ponto Isoelétrico experimental; **MM exp:** Massa Molecular experimental (kDa); **PI teo:** Ponto Isoelétrico teórico; **MM teo:** Massa Molecular teórica (kDa).

Tratamento(spot id)	Acesso	Descrição	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	PI exp	MM exp (kDa)	PI teo	MM teo (kD)
F24 (359)	ABG49123.1	dehydroascorbate reductase [Malus x domestica]	62.8	62.8	100,00%	2,00E-017	64,00%	7,55	67	6,18	23,5
F24 (387)	AAQ04225.1	zeta-carotene desaturase ZDS2 [Malus x domestica]	20.0	20.0	29,00%	84	58,00%	7,86	64	6,43	63,1
F24 (389)	AAR28084.1	calcium-dependent protein kinase [Malus x domestica]	27.7	27.7	45,00%	6,00E-004	46,00%	7,59	64	6,19	60,9
F24 (436)	ABK62847.1	vacuolar H <sup>+</sup> -PPase [Malus x domestica]	19.2	19.2	75,00%	82	35,00%	5,48	58	5,64	79,4
F24 (446)	ADL36843.1	TLP domain class transcription factor [Malus x domestica] >gb ADL36847.1  TLP domain class transcription factor [Malus x domestica]	22.3	22.3	63,00%	0.16	32,00%	7,25	58	9,36	46,7
F24 (482)	ACY82514.1	mitogen-activated protein kinase [Malus x domestica]	19.2	19.2	33,00%	0.28	48,00%	5,48	52	5,12	41,9
F24 (540)	ABK62847.1	vacuolar H <sup>+</sup> -PPase [Malus x domestica]	19.2	19.2	75,00%	82	35,00%	5,11	46	5,64	79,4
F24 (541)	AEJ72565.1	putative serine/threonine kinase [Malus x domestica]	21.6	21.6	83,00%	13	31,00%	6,72	46	6,82	52,4
F24 (626)	AAX33232.1	secreted alpha-amylase [Malus x domestica]	19.2	19.2	51,00%	0.11	45,00%	6,17	41	5,16	44,1
F24 (639)	ACB97678.1	granule bound starch synthase Ib precursor [Malus x domestica]	21.9	21.9	52,00%	59	31,00%	7,44	40	7,57	67,2
F24 (678)	CBL94183.1	putative type-b response regulator (sensor histidine kinase) [Malus x domestica]	20.4	20.4	52,00%	0.20	26,00%	5,68	38	5,68	73,5
F24 (734)	ADL36577.1	ARF domain class transcription factor [Malus x domestica]	19.7	19.7	65,00%	0.19	67,00%	9,57	36	6,19	77,6
F24 (929)	ABK62847.1	vacuolar H <sup>+</sup> -PPase [Malus x domestica]	19.2	19.2	75,00%	82	35,00%	6,33	29	5,64	79,4

**Tabela 7:** Proteínas identificadas da cv. Fuji, expressadas exclusivamente às 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. **Acesso:** código de identificação das proteínas (número de acesso); **Query coverage:** correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; **E-value:** Valor esperado; **Max Ident:** porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. **PI exp:** Ponto Isoelétrico experimental; **MM exp (kDa):** Massa Molecular experimental; **PI teo:** Ponto Isoelétrico teórico; **MM teo (kDa):** Massa Molecular teórica.

Tratamento(spot id)	Acesso	Descrição	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	PI exp	MM exp (kDa)	PI teo	MM teo (kDa)
F48 (1018)	ABG23809.1	putative NBS-LRR disease resistance protein [Malus x domestica]	20.8	20.8	84,00%	0.19	28,00%	4,08	26	6,48	18,5
F48 (1047)	CBL94154.1	putative polyprotein (retrotransposon protein) [Malus x domestica]	65.1	65.1	69,00%	3,00E-017	61,00%	4,18	25	8,12	15,7
F48 (1279)	ACM48194.1	S53-RNase protein [Malus x domestica]	17.7	17.7	62,00%	0.21	36,00%	7,58	17	9,48	20,2
F48 (482)	AAX89397.1	flavanon 3 beta-hydroxylase [Malus x domestica]	20.0	20.0	39,00%	0.18	39,00%	8,53	51	5,43	40,9
F48 (506)	ADE43139.1	SFBβgamma protein [Malus x domestica]	23.1	23.1	25,00%	0.11	38,00%	3	48	4,78	45,5
F48 (562)	ACZ98535.1	transmembrane domain protein [Malus x domestica]	21.2	21.2	33,00%	0.14	36,00%	7,75	44	9,2	47,7
F48 (591)	ADL36846.1	TLP domain class transcription factor [Malus x domestica]	20.4	20.4	20,00%	0.14	50,00%	9,71	43	9,71	47,7
F48 (612)	AEQ27741.1	receptor-like protein [Malus x domestica]	20.8	20.8	34,00%	0.12	43,00%	6,73	42	5,25	109,4
F48 (628)	T17104	translation initiation factor eIF-2 beta chain - apple tree (fragment) >gb AAC06384.1  translation initiation factor 2 beta [Malus x domestica]	20.8	20.8	30,00%	0.12	37,00%	6,48	41	5,54	47,2
F48 (666)	BAA92350.1	l-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [Malus x domestica]	82.4	82.4	82,00%	8,00E-023	83,00%	5,86	39	6,47	54,9
F48 (684)	ACF18101.1	terminal flower 1 [Malus x domestica] >gb ACF18102.1  terminal flower 1 [Malus x domestica]	20.4	20.4	72,00%	0.11	37,00%	6,64	38	8,09	18,4
F48 (797)	CAJ14853.1	maturase K [Malus x domestica]	47.0	47.0	64,00%	2,00E-010	87,00%	8,52	33	9,48	57,5
F48 (823)	AAV50006.1	lipoxigenase [Malus x domestica]	21.2	21.2	27,00%	0.15	44,00%	8,59	32	4,44	14,2

**Tabela 8:** Proteínas identificadas da cv. Gala, expressadas exclusivamente às 24 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. **Acesso:** código de identificação das proteínas (número de acesso); **Query coverage:** correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; **E-value:** Valor esperado; **Max Ident:** porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. **PI exp:** Ponto Isoelétrico experimental; **MM exp (kDa):** Massa Molecular experimental; **PI teo:** Ponto Isoelético teórico; **MM teo (kDa):** Massa Molecular teórica.

Tratamento(spot id)	Acesso	Descrição	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	PI exp	MM exp (kDa)	PI teo	MM teo (kDa)
G24 (698)	CBL94161.1	putative copper-binding family protein [Malus x domestica]	18.5	18.5	36,00%	98	42,00%	8,29	35	5,96	37,3
G24 (493)	ACL13549.1	delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase protein [Malus x domestica]	20.4	20.4	67,00%	23	43,00%	4,71	46	6,33	61,8
G24 (451)	BAF02915.1	polyamine oxidase [Malus x domestica]	26.9	26.9	64,00%	6	26,00%	9,4	48	5,2	55,7
G24 (236)	BAI44431.1	putative UDP-galactose-flavonoid 3-O-galactosyltransferase [Malus x domestica]	21.2	21.2	45,00%	17	53,00%	5,72	83	5,31	52,5
G24 (147)	ABY47995.1	carotenoid cleavage dioxygenase 4 [Malus x domestica]	23.5	23.5	56,00%	30	33,00%	4,59	122	6,29	62,1
G24 (1361)	AAZ79374.1	anthocyanidin synthase [Malus x domestica]	42.7	42.7	97,00%	2,00E-009	54,00%	7,74	14	5,72	40,3
G24 (1360)	ADL36776.1	MYBR domain class transcription factor [Malus x domestica]	19.6	19.6	47,00%	36	50,00%	3,13	14	7,77	34,9
G24 (1298)	ACZ44835.1	glycosyltransferase [Malus x domestica]	17.7	17.7	64,00%	0.17	33,00%	6,06	15	5,83	52,8

**Tabela 9:** Proteínas identificadas da cv. Gala, expressadas exclusivamente às 48 horas após a inoculação com o *C. gloeosporioides*. **Acesso:** código de identificação das proteínas (número de acesso); **Query coverage:** correspondência, em forma de porcentagem, entre a sequência dos peptídeos identificados e a sequência da proteína candidata; **E-value:** Valor esperado; **Max Ident:** porcentagem que indica a quantidade de aminoácidos idênticos que existe entre a sequência dos peptídeos identificados, e a sequência da proteína candidata. **PI exp:** Ponto Isoelétrico experimental; **MM exp:** Massa Molecular experimental (kDa); **PI teo:** Ponto Isoelético teórico; **MM teo** (kDa): Massa Molecular teórica.

Tratamento(spot id)	Acesso	Descrição	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	PI exp	MM exp (kDa)	PI teo	MM teo (kDa)
G48 (775)	ABQ95657.1	auxin hydrogen symporter	20.4	20.4	70,00%	0.16	28,00%	3,97	15	5,13	45,3
G48 (755)	AAV49507.1	L-galactose-1-phosphate phosphatase	18.9	18.9	33,00%	0.62	44,00%	4,39	15	5,19	29
G48 (742)	Q9ZPB7.3	RecName: Full=Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1;	22.7	22.7	53,00%	46	34,00%	4,37	16	6	54,2
G48 (724)	BAF02915.1	polyamine oxidase [Malus x domestica]	18.9	18.9	60,00%	95	33,00%	4,41	16	5,2	55,7
G48 (540)	ADL36782.1	MYBR domain class transcription factor [Malus x domestica]	20.0	20.0	65,00%	0.12	37,00%	9,78	25	9,77	35
G48 (410)	AAAY56753.1	DELLA protein [Malus x domestica]	18.9	18.9	24,00%	0.32	70,00%	5,52	34	5,53	59,7