

AMANDA EMY GONÇALVES

**Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa e
formação de tubos de anastomose conidial de *Colletotrichum* spp.
da macieira**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de mestre
em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Marciel João Stadnik

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Amanda Emy

Determinação de grupos de compatibilidade vegetativa e formação de tubos de anastomose conidial de *Colletotrichum* spp. da macieira / Amanda Emy Gonçalves ; orientador, Marciel João Stadnik - Florianópolis, SC, 2014.
118 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. *Colletotrichum* spp.. 3. macieira. 4. Tubos de anastomose. 5. Compatibilidade vegetativa. I. Stadnik, Marciel João. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. III. Título.

DEDICATÓRIA

A Deus, de quem e para quem são todas as coisas.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade e pela disponibilização da estrutura para realização deste trabalho;

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais da Universidade Federal de Santa Catarina pelo aprendizado e pela oportunidade;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos;

Ao professor Marciel, por todas as oportunidades que me deu, não só agora, como também no período de graduação, o que me auxiliou muito a chegar onde eu sempre desejei. Agradeço também por todo o crescimento que me possibilitou, e por dizer que nada é impossível, me instigando a persistir;

Ao professor Turner B. Sutton, da Universidade do Estado da Carolina do Norte, pela gentileza e disposição em enviar alguns isolados utilizados no presente trabalho.

Aos meus pais Alzira e Jorge, e irmão Romel, por me ajudar no que podiam e por tantas vezes ter que compreender minha constante ausência;

À dona Edna, que tantas vezes me ajudou a lavar minha ‘interminável’ pilha de placas de Petri, sem que nem mesmo pedisse ajuda. Agradeço pelas palavras de esperança, fé e persistência;

Ao pessoal do Laboratório de Fitopatologia, por todo o aprendizado e convívio. Agradecimentos especiais ao Mateus, Cristiane, Aline e Felipe, pelas contribuições prestadas para realização deste trabalho e por sempre se disponibilizar a ajudar, mesmo com tantas atribuições;

Aos amigos, simplesmente pela alegria de tê-los. Agradecimentos especiais a Ricardo, Pedro, Ana Paula, Tirzá,, Ariane, Renata, Manoela e André, pela compreensão e por nunca desistirem de mim.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

“...e se não tiver amor, nada disso me valerá”
(1Co 13:8)

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	ii
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
LISTA DE ANEXOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo Geral.....	3
2.2. Objetivos específicos.....	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1. O hospedeiro: <i>Malus domestica</i> (Borkh.).....	5
3.2. As doenças causadas por <i>Colletotrichum</i> spp.....	6
3.2.1. Podridão Amarga	6
3.2.2. Mancha Foliar de <i>Glomerella</i>	7
3.3. Variabilidade genética de fungos	9
3.4. Parassexualidade	10
3.5. Compatibilidade Vegetativa.....	12
3.6. Tubos de anastomose.....	15
4.0. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1. Origem e conservação dos isolados.....	19
4.2. Determinação dos grupos de Compatibilidade Vegetativa	20
4.2.1. Obtenção de mutantes nit.....	20
4.2.2. Classificação fenotípica dos mutantes <i>nit</i>	20
4.2.3. Seleção e conservação de testers.....	21

4.3.	Monitoramento da formação de estruturas pré-infectivas, tubos de anastomose conidial e migração de DNA	22
4.3.1.	Obtenção de conídios.....	22
4.3.2.	Ensaio sobre lâminas de poliestireno	23
4.3.3.	Ensaio sobre folhas destacadas	26
4.4.	Delineamento experimental e Análise estatística	29
5.	RESULTADOS	30
5.1.	Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa.....	30
5.1.1.	Geração de mutantes nit.....	30
5.1.2.	Classificação fenotípica	32
5.1.3.	Obtenção de testers.....	32
5.1.4.	Pareamentos entre isolados mutantes	33
5.2.	Monitoramento do desenvolvimento de estruturas pré-infectivas, tubos de anastomose conidial e migração de DNA.....	39
5.2.1.	Ensaio sobre lâminas de poliestireno	39
5.2.2.	Ensaio sobre folhas destacadas	48
6.	DISCUSSÃO	51
7.	REFERÊNCIAS	60
8.	ANEXOS	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Número mutantes não utilizadores de nitrato obtidos de isolados brasileiros e uruguaios de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum nymphaeae*, *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum karstii*, obtidos a partir de folhas e frutos de macieira

Tabela 2. Grupos de compatibilidade vegetativa de mutantes nit de isolados brasileiros de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum karstii*, causadores de Mancha foliar de Glomerella e Podridão Amarga em macieira

Tabela 3. Grupos de compatibilidade vegetativa de mutantes nit de isolados uruguaios de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum fragariae*, causadores de Podridão Amarga em macieira.

Tabela 4- Densidade (DC), tempo de máxima germinação (TMG) e percentual de germinação conidial (GC) e de formação de apressórios (FA) e apressórios melanizados (FAM) por isolados de *Colletotrichum* spp. incubados sobre lâminas de poliestireno.

Tabela 5- Classificação dos tipos de conexão e total de tubos de anastomose conidial (TACs) formados após 24h de incubação de conídios de *Colletotrichum* spp. sobre lâminas de poliestireno.

Tabela 6- Correlação entre densidade (DC), percentual de germinação (GC), tempo de máxima germinação (TMG), formação de apressórios (FA), apressórios melanizados (FAM), total de tubos de anastomose conidial (TACs) e tipos de conexões formadas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum acutatum* da macieira sobre lâminas de poliestireno.

Tabela 7- Densidade (DC), percentual de germinação (GC), total de tubos de anastomose conidiais (TACs) e diferentes tipos de conexões formadas por conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Collettotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum fragariae* incubados por 48h sobre folhas de macieira.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Folhas de macieira cultivar ‘Gala’ com sintoma de mancha foliar de *Glomerella*, com severidade crescente da esquerda para direita, (A) e fruto da cultivar ‘Pink lady’ com sintoma de podridão amarga (B).

Figura 2- Vias da utilização do nitrato e hipoxantina em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*.

Figura 3- Metodologia para realização de ensaios de monitoramento da formação de tubos de anastomose conidial sobre lâminas de poliestireno, em microscopia de luz e de fluorescência.

Figura 4- Categorias para classificação de tubos de anastomose conidial (TACs) de acordo com o tipo de conexão estabelecida sobre lâminas de poliestireno e sobre folhas destacadas. Estruturas em amarelo ou vermelho representam apressório melanizado e núcleo, respectivamente.

Figura 5- Metodologia para realização de ensaios de monitoramento da formação de tubos de anastomose conidial sobre folhas destacadas de macieira, em microscopia de luz e de fluorescência.

Figura 6- Desenvolvimento de setores resistentes a clorato formado por isolado MANE 72 em meio Batata Dextrose Ágar + $KClO_3$, após 20 dias de incubação.

Figura 7- Pareamentos entre nit mutantes de *Colletotrichum spp.* do mesmo isolado e desenvolvimento de micélio denso na zona de intersecção entre as colônias. a) MANE 51; b) C21; c) MANE 72; d) C29 e e) MANE 143.

Figura 8- Pareamentos entre o tester do grupo de compatibilidade vegetativa 4 com mutantes nit de outros isolados em placas multipoços contendo meio mínimo.

Figura 9- Distribuição percentual de isolados de *Colletotrichum spp.* causadores de Podridão Amarga e Mancha Foliar de *Glomerella* nos grupos de compatibilidade vegetativa. A) isolados coletados no Brasil, e B) Uruguai. nd= Não definido.

Figura 10- Percentual de conexões do tipo tubo-tubo (t-t), conídio-conídio (c-c) e tubo-conídio (t-c) de tubos de anastomose conidial (TACs) formados por conídios de *Colletotrichum* spp. da maçeira, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Figura 11- Desenvolvimento dos diferentes tipos de conexões de tubos de anastomose (t-t, c-c, t-c) de *Colettotrichum* spp. ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno. t-t= Conexão do tipo tubo-tubo; c-c= conídio-conídio e t-c= tubo-conídio.

Figura 12- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial sobre lâminas de poliestireno a) Isolado C29 sob campo claro e coloração com Azul de Tripán; b) Isolado C29 em microscopia de fluorescência e coloração com Calcofluor White; c) Isolado C29 em microscopia de fluorescência e coloração do material genético com Iodeto de Propídio; d) Isolado C38 sob microscopia de fluorescência corado com Calcofluor White; e) Isolado MANE 143 em microscopia de fluorescência e coloração do material genético com Iodeto de Propídio; f) Isolado MANE 143 em microscopia de fluorescência e coloração do material genético com DAPI. Barra=10 µm. Setas=TACs. Asterítico= apressório hialino.

Figura 13- Desenvolvimento de estruturas pré-infectivas por conídios de isolados de *Colletotrichum fragariae* (a) e *Colletotrichum gloeosporioides* (b, c, d) visualizados por microscopia de luz com adição de Azul de Tripán (a, c, d) e microscopia de fluorescência com Calcofluor White (b), após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno. a, b, c e d mostram o desenvolvimento de tubos germinativos e apressórios melanizados por conídios dos isolados C15, MANE 70, MANE 147 e MANE 55, respectivamente. Barra= 10 µm. *= Apressórios melanizados.

Figura 14- Desenvolvimento de estruturas pré-infectivas e tubos de anastomose por conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (a, b, c), *Colletotrichum fragariae* (d) e *Colletotrichum nymphaeae* (e, f), visualizados em microscopia de luz com adição de Azul de Tripán (b, c, d, e) e microscopia de fluorescência com Calcofluor White (a, d), após 48h de incubação sobre folhas destacadas. a e b) Isolado C29 com formação de tubos de anastomose conidial; c e d) Isolados MANE 147 e C15, respectivamente, sem formação de tubos de anastomose conidial e desenvolvimento de apressórios melanizados e; e) e f) Isolado MANE 143 com formação de tubos de anastomose conidial.

LISTA DE ABREVIATURAS

MANE- Micoteca Anne Löre Schroeder

NCSU- North Caroline State University

BDA- Batata Dextrose Agar

MM- Meio Mínimo

MB- Meio Basal

MFG- Mancha Foliar de Glomerella

PA- Podridão Amarga

Cg- Colletotrichum gloeosporioides

Ca- Colletotrichum acutatum

Cn- Colletotrichum nymphaeae

Cf- Colletotrichum fragariae

Ck- Colletotrichum karstii

DC- Densidade Conidial

TMG- Tempo de Máxima Germinação Conidial

GC- Germinação Conidial

FA- Formação de Apressórios

FAM- Formação de apressórios melanizados

TAC- Tubos de Anastomose Conidial

t-t- Tubos de Anastomose Conidial com conexão do tipo tubo-tubo

c-c- Tubos de Anastomose Conidial com conexão do tipo conídio-conídio

t-c- Tubos de Anastomose Conidial com conexão do tipo tubo-conídio

MAP- *Mitogen Activated Protein*

GFP- *Green Fluorescent Protein*

RFP- *Red Fluorescent Protein*

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1- Percentual de germinação conidial de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 2- Percentual de formação de apressórios por conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 3- Percentual de formação de apressórios melanizados por conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira que formaram apressório, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 4- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-t formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 5- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo c-c formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 6- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 7- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial totais formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 8- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-t, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 9- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo c-c, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 10- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 11- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 12- Valores de t calculado obtidos a partir do teste de correlação das variáveis Densidade (DC), tempo de máxima germinação (TMG) e percentual de germinação conidial (GC) e de formação de apressórios (FA) e apressórios melanizados (FAM), formação de tubos de anastomose conidial (TAC) total, com conexão do tipo tubo-tubo (t-t), conídio conídio (c-c) e tubo conídio (t-c) de *Colletotrichum* spp., após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Anexo 13- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial (TACs) totais e com conexão do tipo t-t, c-c, t-c, formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, após 48h incubação sobre folhas destacadas.

Anexo 14- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-t, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Anexo 15- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo c-c, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Anexo 16- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Anexo 17- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial total, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Determinação de grupos de compatibilidade vegetativa e formação de tubos de anastomose conidial de *Colletotrichum* spp. da macieira

RESUMO

A Podridão Amarga (PA) e a Mancha Foliar de Glomerella (MFG) estão entre as doenças de maior importância na cultura da macieira, pelo rápido progresso dos sintomas e elevada susceptibilidade da cultivar “Gala”, uma das mais consumidas no mundo. O presente trabalho objetivou determinar os grupos de compatibilidade vegetativa (GCVs) de isolados brasileiros e uruguaios de *Colletotrichum* spp. de PA e MFG e monitorar a formação de tubos de anastomose conidial (TACs) *in vitro* e *in vivo*. Os GCVs foram determinados pelo pareamento em Meio Mínimo (MM) de mutantes defectivos na via de assimilação de nitrogênio. Os mutantes foram gerados em meio BDA+KClO₃ e mantidos em MM. Os isolados foram classificados em mesmo GCV quando seu pareamento resultou na formação de heterocárium. Isolados de complexos ou espécies diferentes nunca pertenceram ao mesmo GCV. Somente um isolado brasileiro de MFG foi incluído em mesmo GCV que isolados uruguaios de fruto. Quatro e nove grupos foram encontrados dentre os isolados uruguaios e brasileiros, respectivamente. Em três GCVs, foram incluídos tanto isolados de PA quanto de MFG. Para monitorar o desenvolvimento de TACs e estruturas pré-infectivas, distribuíram-se gotas de 10 e de 20 µL de suspensão conidial (1x10⁶ conídios/mL) sobre lâminas de poliestireno e superfície de folhas destacadas de macieira. O desenvolvimento foi examinado microscopicamente a cada duas horas de incubação a 25°C, entre 14 e 24h e após 48h, sobre poliestireno e folhas destacadas, respectivamente. O percentual e tempo de máxima germinação, formação e melanização de apressórios foram avaliados. Os TACs foram quantificados e categorizados conforme a conexão em três tipos: tubo-tubo (t-t), tubo-conídio (t-c) e conídio-conídio (c-c). Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* apresentaram elevada germinação e formação mais precoce de apressórios melanizados. As conexões do tipo t-t foram encontradas em menor frequência, para todos os isolados testados. As conexões do tipo c-c foram as mais frequentes em isolados de *Colletotrichum acutatum*. Dentre todos os isolados analisados, os que

apresentaram maior percentual de conexões t-t, também formaram mais t-c. Isolados de *Colletotrichum fragariae* e *C. gloeosporioides* de folha nunca desenvolveram TACs sobre poliestireno ou folhas destacadas. Aqueles que formaram TACs sobre poliestireno também o fizeram sobre a superfície do hospedeiro. Foram observados vários núcleos através dos TACs e alguns conídios com nenhum e mais de um núcleo. Em geral, populações de *Colletotrichum* spp. do Brasil e do Uruguai foram aparentemente distintas, sugerindo que estas mantiveram-se separadas. Os processos de formação de TACs e apressórios parecem ser antagônicos. O desenvolvimento de TACs é um processo comum para *C. gloeosporioides* de frutos e *C. acutatum*. A possível contribuição dos TACs para aumento da variabilidade de *Colletotrichum* spp. é discutida.

Determination of vegetative compatibility groups and formation of conidial anastomosis tubes of *Colletotrichum* spp. of apple

ABSTRACT

Bitter Rot (BR) and Glomerella leaf spot (GLS) are amongst the major apple diseases, due to the fast progress of symptoms and high susceptibility of the cultivar “Gala”, one of most worldwide consumed. The present study aimed to determinate the vegetative compatibility groups of brazilian and uruguayan strains of *Colletotrichum* spp causing BR and GLS as well as to monitor the development of conidial anastomosis tubes (CATs) in vivo and in vitro. VCGs were determined by pairing mutants defective in nitrogen assimilation pathway on Minimal Medium (MM). Mutants were generated on PDA+ KClO₃ medium and kept on MM. Strains were classified in same VCG when pairing led to heterokaryon formation. Strains of different complexes or species never belonged to the same VCG. Only one GLS-brazilian strain was included in the VCG of fruit uruguayan strains. Four and nine groups were found among uruguayan and brazilian strains, respectively. In three VCGs, both PA and MFG strains were included. In order to monitor the development of CATs and pre-infective structures, drops of 10 and 20 µL of conidial suspension (1×10^6 conidios/mL) were distributed on polystyrene slides and detached apple leaves surfaces. The development was microscopically examined at every two hours of incubation at 25°C, from 14 to 24h and at 48h, on polystyrene and detached leaves, respectively. Percentage and time of maximum germination, apressoria development and melanization were evaluated. CATs were quantified and categorized into three types, according to the kind of connections: tube-tube (t-t), tube-conidium (t-c) and conidium-conidium (c-c). Strains of *Colletotrichum gloeosporioides* showed a high percentage of germination and early formation of melanized apressoria. The t-t connections were less frequent for all strains. The c-c connections were the most frequent type for *Colletotrichum acutatum* strains. Among all tested strains, those showing a higher percentage of t-t- connections, also formed more t-c.

Strains of *Colletotrichum fragariae* and *C. gloeosporioides* from leaves never developed CATs, neither on polystyrene nor on detached leaves. Those that formed CATs on polystyrene also did it on host surface. Many nuclei were observed through CATs, such as many conidia with none and more than one nucleus. Generally, populations of *Colletotrichum* spp. from Brazil and Uruguay were apparently distinct, suggesting that they were kept isolated. Appressoria melanization and CATs development seem to be antagonist processes. Formation of CATs is a common process in *C. gloeosporioides* from fruits and *C. acutatum*. The possible contribution of CATs and its consequence for increasing variability in *Colletotrichum* ssp. is discussed.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie amplamente cultivada no mundo, sendo encontrada em praticamente todos os continentes. No Brasil e Uruguai, está entre as frutíferas de clima temperado mais cultivada. No Brasil, a produção está concentrada nas serras e planaltos da região Sul, sendo uma atividade que iniciou na década de 70. No Uruguai, os pomares comerciais encontram-se concentrados nos departamentos de Canelones e Montevideo e San José. A cultura tem um importante papel na economia local, seja pelo potencial de comercialização e exportação, seja pelos empregos diretos e indiretos gerados, estimados em três por hectare.

Entre as diversas doenças que afetam a cultura, destacam-se a Podridão Amarga (PA) e a Mancha Foliar de Glomerella (MFG), ambas causadas por *Colletotrichum* spp. Enquanto a PA é cosmopolita e conhecida há mais de um século atacando os frutos, a MFG é uma doença foliar recente que vem ocorrendo em regiões com condições de clima subtropical úmido. Ambas causam perdas significativas na produção, pela inviabilização do fruto ou pela redução da área fotossinteticamente ativa, respectivamente.

Dentro deste contexto, um fato interessante é que no Uruguai a MFG ainda não foi relatada. Existe um extensa área, que compreende o sul do Rio Grande do Sul e o norte do Uruguai, onde a macieira não é cultivada, o que pode ter contribuído para o isolamento e desenvolvimento de populações geneticamente distintas de *Colletotrichum* nestes países.

Existem isolados patogênicos tanto às folhas quanto aos frutos, e até mesmo a ambos, com diferentes graus de agressividade e com capacidade de infectar diversos cultivares. As características morfológicas e fisiológicas são também bastante diversificadas. Recentemente, novas espécies de *Colletotrichum* têm sido relatadas como agentes causais da MFG ou PA.

Conhecidamente, a variabilidade nestes organismos e transferência de seu material genético através das gerações é dada por mecanismos sexuais e assexuais, sendo os indivíduos clonais mais comumente encontrados. A reprodução parassexual parece ter um papel importante na geração de variabilidade e sobrevivência para alguns

fitopatógenos, como *Aspegillus*, *Fusarium* e até *Colletotrichum lindemutianum*. O processo da parassexualidade parece ter ligação com a ampliação na gama de hospedeiros possíveis, bem como com a geração de novas raças.

A reprodução parassexual pode ocorrer entre hifas maduras ou conídios, pela formação de estruturas especializadas, chamadas de tubos de anastomose, que possibilitam a fusão de hifas. Quando esses tubos são emitidos a partir dos conídios ou tubos germinativos, são especificamente conhecidos como tubos de anastomose conidiais. Através dos tubos de anastomose, podem ocorrer a migração de nutrientes, moléculas sinalizadoras, organelas e material genético. No último caso, são formadas as células heterocarióticas ou heterecárions, podendo ou não ocorrer a fusão dos núcleos e recombinação mitótica.

Somado à observação dos tubos de anastomose conidiais para averiguar a ocorrência do ciclo parassexual e transfêrencia de material genético, o estudo de grupos de compatibilidade vegetativa pode trazer informações adicionais ao estudo destes fenômenos. Pela detecção da formação de hifas heterocarióticas, é possível determinar visualmente quais isolados ou populações têm capacidade de formar tubos de anastomose e trocar material genético entre si. O estudo de grupos de compatibilidade vegetativa também pode discriminar populações muito distintas geneticamente.

Apesar do fenômeno da parassexualidade não ter sido estudado detalhadamente para as espécies de *Colletotrichum* da macieira, isso poderia ajudar a explicar a imensa variabilidade de isolados e espécies capazes de provocar a Podridão Amarga e Mancha Foliar de *Glomerella*.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Determinar os grupos de compatibilidade vegetativa existentes em uma coleção de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira do Brasil e Uruguai e monitorar o desenvolvimento de tubos de anastomose conidial *in vitro* e *in vivo*.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar os Grupos de Compatibilidade Vegetativa de isolados brasileiros e uruguaios de *Colletotrichum* spp. da macieira.
- Monitorar o desenvolvimento de tubos de anastomose conidial por isolados de *Colleotrichum* spp., *in vitro* e sobre folhas destacadas de macieira.
- Averiguar a migração nuclear através dos tubos de anastomose conidial.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O hospedeiro: *Malus domestica* (Borkh.)

A macieira pertence à família Rosaceae, ordem Rosales, Subfamília Pomoideae. As espécies desta subfamília possuem folhas simples, caducas, estipuladas, peninérvias, de bordos dentados e tomentosas na parte abaxial. As flores são inferoviadas, organizadas em inflorescência chamada umbela, pentâmeras, actinomorfas, hermafroditas e possuem 5-2 carpelos. O cálice é persistente, a corola caduca e o fruto do tipo pomo (Bender, 1986).

O centro de origem da macieira encontra-se nas regiões da Ásia Menor, Cáucaso, Ásia Central, Himalaia, Índia e Paquistão e oeste da China, onde ocorrem pelo menos 25 espécies nativas de *Malus* (Juniper; Watkins; Harris, 1994). A cultura da macieira já estava bastante difundida no império Romano, quando as técnicas produtivas foram aperfeiçoadas e difundidas (Harris, Robinson; Juniper, 2002). As migrações dos povos euroasiáticos colaboraram para a disseminação das formas primitivas das macieiras atuais. O número de cultivares de macieira existente atualmente no mundo é imenso e foi obtido através de melhoramento genético, utilizando-se hibridações, seleções clonais e mutações (Ribeiro, 1986).

No Brasil, o início do cultivo de macieira ocorreu provavelmente no município de Valinhos, no estado de São Paulo, com cultivar ‘Ohio Beauty’, na década de 1920 (Silva *et al.*, 2007), mas somente na década de 1970 começou a ter importância econômica, com a implantação de pomares na região sul. Com incentivos fiscais e apoio à pesquisa e extensão, o Sul do Brasil aumentou a produção de maçãs em quantidade e qualidade, fazendo com que o país passasse de importador a auto-suficiente e com potencial de exportação (Valdebenito-Sanhueza, 2003). Atualmente, a produção anual do país é de 1.364.953 toneladas (Fioravango; Lazzarotto, 2012).

A produção brasileira de maçãs concentra-se nos estados Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que participam com 36 e 59%, respectivamente (Bittencourt *et al.*, 2011). Dentre as cultivares mais plantadas no país, destacam-se principalmente a ‘Gala’ e a ‘Fuji’, com colheitas realizadas entre os meses de fevereiro e março e de março e abril, respectivamente (Kreuz; Souza; Petri, 2006). Algumas cultivares

são utilizadas como polinizadoras, como a ‘Willie Sharp’, ‘Granny Smith’, ‘Hawaii’, ‘Starkrimson’ e ‘Pome 3’ (Ribeiro, 1986). Há também as cultivares ‘Catarina’, ‘Duquesa’, ‘Fred Hough’ e a ‘Joaquina’ recentemente desenvolvidas, com a vantagem de carregarem o gene Vf que confere resistência à sarna (*Venturia inequalis* (Cooke) Winter) (Stadnik; Araújo; Valdebenito-Sanhueza, 2009).

No Uruguai, a produção de frutas de espécies caducas encontra-se concentrada no sul do país, especialmente nos departamentos de Montevideu, Canelones, San José e Colonia. O número de plantas é estimado 3,3 milhões de plantas produzindo 45 mil toneladas. As cultivares mais produzidas são as do grupo ‘Red Delicious’, (DIEA, 2013), que juntamente com a polinizadora ‘Granny Smith’ são responsáveis por 75% da produção naquele país (DIEA, 2013, Vivian *et al.*, 2011).

3.2. As doenças causadas por *Colletotrichum* spp.

Dentre as diversas doenças de mancha foliar e podridão de frutos que acometem a cultura da macieira, a Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) e Podridão Amarga (PA) tem destaque (Valdebenito-Sanhueza, 2002; Talamini; Bogo, 2009; Katsurayama; Boneti, 2009). A primeira tem ganhado espaço nos cultivos de alguns países (Wang *et al.*, 2012; Gonzáles; Sutton, 1999), enquanto que a segunda já é amplamente difundida (Gonzáles; Sutton, 2004). Ambas podem gerar grandes perdas na produtividade e qualidade dos frutos (Mondino *et al.*, 2009).

3.2.1. Podridão Amarga

A Podridão Amarga (PA) é uma doença comum e conhecida há mais de um século na cultura da macieira, e encontra-se presente em quase todos os países em que é comercialmente cultivada (Gonzáles; Sutton, 2004; Clinton, 1902). Em condições ideais de temperatura e umidade, pode causar perdas superiores a 50% (Gonzáles; Sutton, 2004; Talamini; Bogo, 2009). Comumente, três espécies são encontradas como agentes causais da PA em frutos de macieira: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding; *H. Schrenk*, *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz; Sacc. e *Colletotrichum acutatum* J. H. Simmonds (Shi *et al.* 1996; Gonzáles; Sutton, 2004). No ano de 2010, quando a incidência de podridão amarga foi de 70% nos pomares do Uruguai, teve-se a primeira

identificação do aparecimento de *Colletotrichum fragariae* como causador da doença (Alaniz *et al.*, 2012).

Diversas espécies que anteriormente eram identificadas como *C. acutatum* sofreram alteração na nomenclatura (Damm, *et al.*, 2012). Uma destas foi *C. nymphaeaeae*, que com esta modificação foi relatada como novo agente causal da PA nos pomares do Sul do Brasil (Velho *et al.*, 2014b). De mesmo modo, outras espécies como *Colletotrichum acerbum*, *Colletotrichum fioriniae*, *Colletotrichum godetiae* e *Colletotrichum salicis* também passaram a ser designadas como causadoras de PA (Damm *et al.*, 2012).

A frequência de aparecimento de cada uma das espécies depende do pomar analisado e parece estar associada às condições ambientais, bem como à fonte inicial de inóculo, período de amostragem, práticas de manejo empregadas e cultivar hospedeira (Shi *et al.* 1996). A incidência é menor em maçãs vermelhas e as variedades ‘Granny Smith’ e ‘Pinky Lady’ são as mais susceptíveis (Mondino *et al.*, 2009).

Os principais sintomas da doença são lesões circulares e anéis concêntricos, frequentemente contendo as estruturas do patógeno na superfície, sendo estas acérvulos, peritécios ou ambas (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 2002). Algumas vezes, lesões em formato de “V” podem ser encontradas quando o fruto é aberto (Mondino *et al.*, 2009; Shi *et al.*, 1996). As condições ótimas de temperatura encontram-se entre 22 e 26°C, porém o patógeno pode surgir em uma faixa muito mais ampla (Valdebenito-Sanhueza *et al.*, 2002).

O fungo é disseminado de um fruto sadio para outro na mesma planta pela água da chuva (Valdebenito-Sanhueza *et al.* 2002). Os insetos, especialmente do gênero *Drosophila*, estão envolvidos com dispersão a longas distâncias (Clinton, 1902).

3.2.2. Mancha Foliar de Glomerella

A Mancha Foliar de *Glomerella* (MFG) é uma doença emergente, que tem se tornado um dos principais problemas que acometem a cultura da macieira no sul do Brasil, pois a cultivar ‘Gala’, a mais cultivada mundialmente, é altamente suscetível (González; Sutton; Correll, 2006). São relatadas três espécies de *Colletotrichum* associadas à MFG: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *Colletotrichum karstii* (Velho *et al.*, 2014) sendo a primeira a principal pela frequência e agressividade (Boneti; Katsurayama, 2009).

Sintomas de MFG foram relatados primeiramente nos pomares de ‘Golden Delicious’, no sudoeste dos EUA (Taylor, 1971). Duas décadas mais tarde, a doença tornou-se um problema naquele país (Gonzáles; Sutton, 1999). No Brasil, a doença foi encontrada inicialmente no sudoeste de São Paulo, disseminando-se na década de 80 para a região metropolitana de Curitiba, onde se estabeleceu (Leite *et al.* 1988).

A doença é restrita às regiões com clima subtropical úmido, tais como sudeste dos EUA (Gonzáles; Sutton, 1999; Taylor, 1971), sul do Brasil (Becker; Katsurayama; Boneti, 2000) e sudoeste da China (Wang *et al.*, 2012). Apesar de existirem diversos pomares comerciais no Uruguai, não houve nenhum relato de aparecimento da MFG até o presente momento (Mondino *et al.*, 2009).

O período de incubação da doença é geralmente curto, surgindo pequenas lesões de coloração vermelho-arroxeadado e forma irregular nas folhas aos dois dias. Entre oito e dez dias após a infecção, as lesões evoluem para manchas necróticas e as folhas tornam-se completamente secas e caem (Araújo; Stadnik, 2013; Katsurayama; Boneti, 2009). O desfolhamento é bastante severo, tendo chegado a até 90% nos pomares da China (Wang *et al.*, 2012), o que reduz a produção no ano posterior (Boneti; Katsurayama, 1999). Nos frutos observam-se pequenas manchas circulares e deprimidas de coloração castanho-avermelhado, que não aumentam de tamanho e nem evoluem para podridão (Figura 1). Estas infecções afetam a estética dos frutos (Mondino *et al.*, 2009).



Figura 1- Folhas de macieira cultivar ‘Gala’ com sintoma de mancha foliar de *Glomerella*, com severidade crescente da esquerda para direita, (A) e fruto da cultivar ‘Cripps Pink’ com sintoma de podridão amarga (B).

3.3. Variabilidade genética de fungos

Espécies que possuem maior variabilidade genética são mais aptas à competição e sobrevivência. Portanto, a aquisição de variabilidade pode gerar uma maior capacidade de sobreviver aos desafios impostos pelas mudanças ambientais e ao rápido desenvolvimento de parasitas e competidores (Carlie; Watkinson; Gooday, 2001). Também, para que ocorra a evolução da espécie através de seleção natural, é necessário que haja variabilidade. O potencial evolutivo de uma população é diretamente proporcional à sua variabilidade genética (McDonald, 1997).

Inúmeros processos podem desencadear a geração de variabilidade genética, sendo a mutação um último recurso. O tamanho do genoma para os diferentes fungos é bastante variável, mas um genoma com 10000 genes poderá ter uma célula a cada 100 como possível novo mutante, a cada geração. Como a maioria das células fúngicas é capaz de dar origem a uma célula vegetativa ou esporos, o número de células numa população que pode sofrer mutação e gerar progênie pode ser bastante elevado (Carlie; Watkinson; Gooday, 2001).

Um número considerável de genes é responsável por uma via de biossíntese, alguns especificando as enzimas envolvidas, outros regulando a atividade da via como um todo. Agentes mutagênicos agem de várias formas e a suscetibilidade do DNA aos diferentes agentes vai depender da sequência de nucleotídeos. Por isso, na presença de um determinado agente mutagênico, alguns genes irão sofrer mutação imediatamente, enquanto outros, com menor frequência. Os agentes mutagênicos tanto matam as células, quanto provocam mutações nestas. Assim, investigações devem ser realizadas para determinar quais doses culminam em maiores proporções de células mutantes entre as sobreviventes. Os agentes mutagênicos mais comumente utilizados na biotecnologia de fungos são os raios-X, radiação ultravioleta (Lockwood *et al.*, 1945; Swanson; Hollaender; Kaufmann, 1948), dimetilsulfonato e nitrosoguanidina (Cantoral *et al.*, 1993).

A maioria das mutações são muito mais deletérias do que benéficas. Diferentes linhagens de células, entretanto, acumulam mutações desfavoráveis diferentes. Assim, a recombinação gera células dicarióticas que podem mascarar as mutações, se estas forem recessivas, através do correto funcionamento complementar dos alelos, num efeito chamado de complementação (Carlie; Watkinson; Gooday, 2001). Como as mutações deletérias são cumulativas, estas podem causar declínio de

certas populações, seja pela inabilidade destas em gerar descendentes, ou pela perda de características vantajosas, que só pode ser contornada por retrocesso, ou pela ocorrência de mutações benéficas compensatórias, no caso de ausência de recombinação (Lynch; Blanchard, 1998).

As formas mais comuns de transmissão de material genético de uma geração para outra são a assexual e sexual. Na primeira, a progênie será um clone mitótico exatamente idêntico ao parental. Na segunda, a recombinação meiótica gera progênie diferenciada da parental (Taylor; Jacobson; Fisher, 1999). Para a maior parte dos fungos fitopatogênicos, a reprodução por via assexual é a mais comum, porém grande parte realiza ciclos sexuais regularmente, alguns até de modo obrigatório, como no caso de algumas ferrugens. Essas populações que realizam ciclos sexuais possuem uma variabilidade genética muito maior do que as que se multiplicam somente por ciclo assexual (Milgroom, 1996).

Há vantagens competitivas oferecidas pelo processo de recombinação genética. A recombinação pode produzir genótipos que podem tornar os organismos mais adaptados a condições ambientais desfavoráveis (Milgroom, 1996). Além disso, indivíduos recombinantes podem adquirir resistência a alguns tipos de fungicidas (Brent; Hollomon, 1988).

Diferentemente de outros organismos, que se utilizam somente das vias sexuais e/ou assexuais para transmitir o material genético de uma geração para outra ou gerar recombinantes, os fungos possuem também mecanismos de parassexualidade (Taylor, Jacobson; Fisher, 1999).

3.4. Parassexualidade

O fenômeno da parassexualidade auxilia o fungo na geração de variabilidade genética e contribui para sua melhor adaptação ao ambiente (Glass; Fleissner, 2006; Tinline; MacNeil, 1969). A variabilidade é gerada pela transferência de material nuclear por conexões chamadas tubos de anastomose. Isto faz com que diferentes núcleos ocupem um citoplasma em comum, estado conhecido como heterocariótico, indispensável para que ocorra a reprodução parassexual (Alexopoulos; Mims, 1907; Tinline; MacNeil, 1969).

O ciclo parassexual é dado pelas seguintes etapas: i) Formação de heterocátons, ii) Fusão dos núcleos distintos no interior da hifa heterocariótica, iii) Formação do núcleo diploide (2n). Nesta etapa, o número de hifas dicarióticas pode aumentar na população devido às

constantes mitoses, quando poderá ocorrer a iv) Recombinação por Crossing-over mitótico. Os recombinantes podem permanecer, e se multiplicar no estado diplóide ou retornar a haploidia, a partir de sucessivas perdas de um cromossomo em cada par de cromossomos homólogos, num processo chamado v) aneuploidia (Alexopoulos; Mims, 1907; Pontecorvo, 1956, Tinline; MacNeil, 1969; Carlie, Watkinson; Gooday, 2001). Embora os eventos de fusão entre núcleos distintos sejam pouco comuns na natureza, bem como o crossing-over mitótico (Pontecorvo, 1956), estes parecem ocorrer em proporções diferentes, conforme a espécie. Em *Aspergillus niger* e *Penicillium chrysogenum*, essas proporções são muito mais elevadas que em outros fungos. Assim, para os Deuteromycetes, o ciclo parassexual pode ter tanta importância na geração de variabilidade quanto o ciclo sexual para os outros fungos (Alexopoulos; Mims, 1907).

Pouco foi relatado sobre a dinâmica nuclear durante o ciclo parassexual e muito menos sobre a ocorrência das etapas de fusão nuclear e crossing-over mitótico no gênero *Colletotrichum*. Para *Colletotrichum lindemuthianum*, foi constatada esta dinâmica, com uso de corantes e proteínas fluorescentes (Roca *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2010). Ishikawa *et al.* (2012) apresentaram evidências da ocorrência de fusão nuclear para este patógeno, utilizando a combinação de duas proteínas fluorescentes.

Embora a geração de recombinantes possa ser limitada na natureza, mesmo pequenas transferências horizontais podem ter importância no processo evolutivo. Ainda que todo o ciclo não seja completado, existem outras formas de troca genética que requerem apenas a etapa de formação do heterocácion (Debets, 1998). Mesmo sem ocorrência de fusão nuclear, o transpósion *Tag* teve a capacidade de migrar de um núcleo para outro em heterocácion de *Neurospora crassa* por meio de facilitador citoplasmático (Kinsey, 1990). Adicionalmente, a transferência de material genético entre núcleos não requer a existência de um heterocácion estável, podendo também ocorrer naqueles considerados transientes. Assim, o ciclo parassexual poderia ser um modo de transferência horizontal de transpósions, cromossomos, ou até fragmentos destes. Todavia, tais eventos são de difícil detecção em laboratório (Debets, 1998).

A parassexualidade com a formação dos heterocácions foi fortemente associada à patogenicidade, mais precisamente à ampliação na gama de hospedeiros e geração de novas raças (Pontecorvo, 1956;

Jacobson; Gordon, 1988). Uma demonstração disso é o trabalho realizado por Buxton (1956), utilizando duas raças de *Fusarium oxysporum* f.sp. *pisi*, da ervilha, uma patogênica à variedade 'Onward', mas não à 'Alaska' e 'Delwiche Commando' e outra patogênica a ambas e não-patogênica à 'Delwiche Commando'. Dos três recombinantes obtidos, dois foram patogênicos à 'Onward' e 'Delwiche Commando', e um provocou doença nas três variedades. Desta forma, como o ciclo parassexual pode estar relacionado à geração de novas raças, este processo pode ser um tema de interesse em pesquisas dentro da fitopatologia (Pontecorvo, 1956).

3.5. Compatibilidade Vegetativa

A compatibilidade vegetativa é um marcador genético estável que pode ser usado para determinar relações genéticas entre as populações de patógenos, baseando-se na formação de heterocárions entre isolados pareados em testes de complementariedade (Somrith; Singburadom; Piasai, 2011). Isolados que pertencem ao mesmo Grupo de compatibilidade vegetativa (GCV) tendem a ter um pool gênico em comum (Leslie, 1993) e assim, podem ser patologicamente e fisiologicamente diferentes dos isolados que não estão classificados no mesmo grupo (Joaquim; Rowe, 1991; Nitzan, Tsrer; Johnson 2006; Nitzan *et al.*, 2002). Isolados que são vegetativamente compatíveis podem formar populações subespecíficas, que tendem a ser geneticamente isoladas na natureza e são chamadas grupos de compatibilidade vegetativa. A compatibilidade vegetativa é controlada por uma série de genes denominados vic (incompatibilidade vegetativa) ou het (incompatibilidade de heterocárions). Tipicamente, a fusão de hifas ocorre entre isolados independentemente do genótipo, mas uma reação letal de incompatibilidade ocorre se os isolados diferirem-se em um ou mais dos seus locus vic. Geralmente, mais de dez loci vic estão presentes numa dada espécie, com cada locus existindo em dois alelos. Isolados que têm capacidade de formar heterocárions são considerados pertencentes ao mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (Sanei; Razavi, 2011).

Para verificação da compatibilidade vegetativa são utilizados frequentemente mutantes que não utilizam certas fontes de carbono ou nitrogênio, ou auxotróficos, os morfológicos e os sensíveis a agentes inibidores, entre outros (Azevedo, 2004). Estes mutantes costumavam ser obtidos através de irradiação (Pontecorvo; Semonti, 1954; Buxton, 1956).

Posteriormente, começou a ser amplamente utilizado o clorato de potássio para obtenção de mutantes não utilizadores de nitrato como fonte de nitrogênio, o ácido fluoroacético para os mutantes não utilizadores de acetato como fonte de carbono (Armitt, McCullough, Roberts, 1976; Tahoun, 1993) e selenato, para obter aqueles incapazes de utilizar sulfato como fonte de enxofre (Hawthorne; Rees-Georg, 1996; Jacobson; Gordon, 1998). A gama de mutantes a ser utilizada é bastante vasta (Azevedo, 2004), todavia, os mutantes auxotróficos não utilizadores de nitrato são os mais frequentemente adotados para estudos genéticos.

Uma das grandes vantagens na aplicação do gene da nitrato redutase é a fácil obtenção de mutantes espontâneos, por seleção positiva para resistência ao clorato (Pereira *et al.*, 2003, Leslie, 1993). O clorato é análogo ao nitrato e sua redução a clorito pela nitrato redutase resulta em toxidez para célula. Portanto, isolados sensíveis ao clorato são capazes de converter nitrato a nitrito, enquanto as resistentes são incapazes (Correll; Klittich; Leslie, 1987). Assim, as colônias que crescem em meio de cultura com clorato, são resistentes a este, mas não necessariamente são mutantes da nitrato redutase. Mutações em no mínimo cinco genes podem levar a resistência ao clorato. Assim, é necessário fazer uma discriminação fenotípica por meio de um teste de crescimento em meio mínimo contendo as seguintes fontes de nitrogênio: Nitrato, nitrito, hipoxantina, ácido úrico e amônio. A razão para o uso da hipoxantina é que tanto a nitrato redutase quanto a purina desidrogenase são dependentes do cofator molibdênio. Por isso, uma mutação no gene que transcreve para a biossíntese deste, impossibilitaria a conversão de nitrito a nitrato, bem como de hipoxantina a xantina e sua utilização como fonte de nitrogênio (Figura 2) (Correll, Klittich; Leslie, 1987; Pereira *et al.*, 2003).

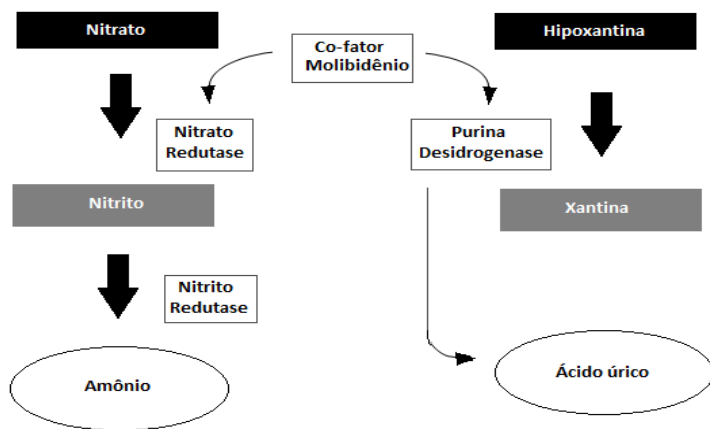


Figura 2- Vias da utilização do nitrato e hipoxantina em *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*. Adaptado de Correll; Klittich; Leslie (1987).

Os mutantes que crescem normalmente em nitrato, hipoxantina, amônio e ácido úrico, mas apresentam-se ralos sobre nitrato foram considerados *nit1*, com mutação no locus estrutural da nitrato redutase. Os que crescem somente com característica selvagem em amônio, são considerados *nit2*, com mutação no locus principal da nitrato redutase. Mutantes *nit3* são aqueles que têm mutação no locus regulatório específico da via e desenvolvem-se com característica similar aos *nit1*, com a diferença que crescem ralos em nitrato. Mutantes que crescem ralos em nitrato e hipoxantina e, desenvolvem micélio aéreo denso nas outras fontes de nitrogênio possuem mutação no locus do cofator molibidênio e são chamados *nitM* (Correll, Klittich; Leslie, 1987; Brooker, Leslie; Dickman, 1991; Garret; Amy, 1978; Marzluf, 1981). Os mutantes *nit1*, *nit3* e *nitM* eram anteriormente denominados *nitA*, *nitB* e *nitC*, respectivamente (Puhalla, 1985; Correll, Puhalla; Schneider, 1986). O mutante *nitM* é o que melhor complementa com as outras classes fenotípicas, e por isso foi designado como ‘tester’ e assim vem sendo utilizado para diversas espécies (Correll, Klittich; Leslie, 1987; Strausbaugh, 1993; Sanei; Razavi, 2011; Huang *et al.*, 2013).

Os testes com GCVs podem ser menos laboriosos e mais precisos que os testes de patogenicidade na diagnose e identificação de *forma specialis*, raça, grupo de patogenicidade, dentre outros (Leslie, 1993). Os testes de patogenicidade para esta finalidade geralmente são inconclusivos, devido à grande variação ambiental a que os materiais vegetais são submetidos, provocando ampla diversidade na expressão dos sintomas, mesmo em casa de vegetação (Correll, Puhalla; Schneider, 1986). Além disso, a avaliação dos GCVs é considerada simples (Leslie, 1996) e para condução de experimentos são exigidos materiais comumente encontrados em laboratórios de microbiologia, sem a necessidade de equipamentos sofisticados, como para outras técnicas de caracterização genética (Leslie, 1996, Correll, Klittich; Leslie, 1987).

Para *Colletotrichum* spp. da macieira, estudos sobre GCVs já foram realizados por Beever, Olsen; Parkes (1995), Brooker, Leslie; Dickman (1991) e Lardner *et al.* (1999). Isolados coletados no Brasil foram classificados em GCVs por Hamada (2005) e Gonzáles, Sutton; Correll (2006).

3.6. Tubos de anastomose

Os tubos de anastomose permitem a conexão entre células fúngicas, que passam a agir como um só indivíduo. Através destas conexões, podem ser trocados nutrientes, água, moléculas sinalizadoras, núcleo, mitocôndrias e outras organelas (Read *et al.*, 2009). Assim, os tubos de anastomose podem aumentar as chances de sobrevivência num ambiente pobre em nutrientes, ou quando estes estiverem heterogeneamente distribuídos (Roca; Read; Wheals, 2005). Além disso, essas estruturas podem propiciar a recombinação parassexual, contribuindo para ampliação da variabilidade genética em fungos pela transferência horizontal de genes (Roca; Read; Wheals, 2005; Roca *et al.*, 2004).

Tubos de anastomose são também denominados de hifas de fusão (Ruiz-Roldán *et al.*, 2010; Pandey *et al.*, 2004). Porém, há um tipo especial dentre estas, que são as emitidas por conídios ou tubos germinativos, conectando estas estruturas, sendo conhecidas por tubos de anastomose conidial (TACs). Esses diferem morfológicamente e fisiologicamente daqueles emitidos pelas extremidades da colônia madura e parecem estar regulados por mecanismos genéticos e bioquímicos diferentes (Read *et al.*, 2009). A formação de TACs está

associada ao pH do meio e é inibida pela presença de triptofano, o que não ocorre com os tubos de anastomose formado nas margens da colônia adulta (Fischer-Harman *et al.*, 2012). Embora distintos, esses processos parecem estar conectados, pois mutantes defectivos na formação de TACs não conseguem formar hifa de fusão na colônia adulta (Read; Goryachev; Lichius, 2012).

Diferentemente do que ocorre com *N. crassa*, em espécies como *C. lindemuthianum*, o desenvolvimento dos TACs é mais lento, e muitas vezes não é fácil discernir claramente o TAC de um tubo germinativo (Ishikawa *et al.*; 2010). As características que diferenciam de tubos germinativos comuns dos TACs são que estes se apresentam mais finos e curtos, têm crescimento determinado, geralmente não possuem ramificações e a indução de sua formação é dependente da densidade conidial (Read *et al.*, 2009; Roca; Read; Wheals, 2005). Adicionalmente, TACs nunca se tornam hifas vegetativas após serem colocados no meio de cultura e seu desenvolvimento não é inibido pela mucilagem do acérvulo (Roca *et al.*, 2003). Além disso, enquanto células meramente vegetativas evitam umas às outras, com o objetivo de melhor explorar os nutrientes disponíveis no meio, os tubos de anastomose crescem em direção ao outro. Este autotropismo positivo resulta em contato apical entre as hifas ou pegs envolvidos (Roca; Read; Wheals, 2005; Carlie; Watkinson; Gooday, 2001).

As circunstâncias que favorecem a formação de tubos de anastomose ainda não estão elucidadas completamente. Em algumas espécies este evento pode ser observado em colônias jovens e monospóricas e, em outras, em colônias mais velhas (Carlie; Watkinson; Gooday, 2001). Ishikawa *et al.*, 2010 observaram que tubos de anastomose de *C. lindemuthianum* foram mais frequentes após maior tempo de incubação e quando os conídios foram coletados de colônias mais velhas. Além disso, concentrações mais altas de conídios e sua incubação em água favoreceram a formação destas conexões, em comparação a outros meios mais nutritivos como o BD (batata-dextrose). Isto ocorre porque, possivelmente, a indução à formação de tubos de anastomose é dependente da densidade de conídios (Roca *et al.*, 2005) e parece estar relacionada à deficiência nutricional (Ishikawa, *et al.*, 2010). Porém, isso parece ser bastante variável de acordo com a espécie, pois para que *N. crassa* forme TACs é necessário que nutrientes estejam presentes no meio (Roca *et al.*, 2005).

Podem ser destacadas três fases no processo de formação dos tubos de anastomose: indução, quimioatração e fusão (Roca; Read; Wheals, 2005). Na formação de TACs, a fase de indução é dada por um mecanismo de ‘*quorum sensing*’, que monitora a população por meio da liberação de moléculas sinalizadoras para o meio. Em *N. crassa*, o sinalizador parece ativar a cascata da MAP-kinase. Dois mutantes bloqueados para a formação de tubos de anastomose sofreram mutações nos genes que codificam para NRC-1 e MAK-2 (Roca *et al.*, 2005).

A fase de quimioatração de TACs está relacionada com o gene *so*, responsável por regular a síntese ou liberação de uma substância quimioatratora e a percepção deste sinal químico (Roca; Read; Wheals, 2005). Mais especificamente, esta fase ocorre pela troca oscilatória de requerimentos das proteínas SO e MAK-2 pelas extremidades dos TACs em formação. Assim, quando uma extremidade de um TAC acumula transientemente MAK-2, o mesmo ocorre de modo simultâneo com o outro TAC, que acumula a proteína SO, sendo este processo invertido posteriormente (Fleissner *et al.*, 2009). A proteína SO atua como emissor de sinal e a MAK-2 como receptor. Essa oscilação anti-fase pode ocorrer entre 4-6 vezes durante o processo de quimioatração de TACs em *N. crassa* e, por isso, o processo foi denominado de ‘*ping pong*’ (Read; Goryachev; Lichius, 2012). Mutantes no gene *so* podem formar os tubos de anastomose, mas não conseguem direcionar seu crescimento em direção ao outro (Roca; Read; Wheals, 2005).

Na fase de fusão, ocorre provavelmente a secreção de compostos adesivos e enzimas degradadoras da parede celular (Roca; Read; Wheals, 2005). Algumas proteínas parecem estar envolvidas na etapa de fusão, como a HAM-6, HAM-7 e HAM-8, mediadoras do evento de fusão da membrana plasmática (Fu *et al.*, 2011).

A fusão entre tubos de anastomose é bastante comum em Ascomycetes, Basidiomycetes e fungos mitospóricos, já tendo sido relatada em 21 gêneros e 73 espécies (Roca; Read; Wheals, 2005). A formação de TACs já foi estudada intensivamente *in vitro* para *N. crassa*. (Fleissner *et al.*, 2005; Fleissner *et al.*, 2009; Roca *et al.*, 2005; Eaton *et al.* 2012), para *Fusarium oxysporum* (Ruiz-Roldán *et al.*, 2010) e *C. lindemuthianum* (Ishikawa *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2012; Roca *et al.*, 2003; Roca *et al.*, 2004), *C. gossypii* do algodão e *C. gloeosporioides* do cafeeiro (Roca *et al.*, 2003).

Em condições naturais, sobre a superfície do hospedeiro, a formação de TACs foi quantificada para *C. lindemuthianum* (Ishikawa *et*

al., 2009) e observada para *C. cowpea* (Latunde-Dada *et al.*, 1999) e *C. acutatum* da amêndoa (Wharton; Diéguez-Uribeondo, 2004). Para *C. gloeosporioides* da macieira, observou-se a formação de TACs sobre o tecido do hospedeiro por dois isolados de folha (Araújo; Stadnik, 2013b). Porém, para espécies de *Colletotrichum* da macieira, resultados detalhados que mostrem maiores evidências da formação de TACs e estudos que revelem como é dado seu desenvolvimento ainda necessitam ser realizados, visto a grande variabilidade de isolados e agentes causais existentes.

4.0. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Origem e conservação dos isolados

Um total de 26 isolados brasileiros e 15 uruguaios do gênero *Colletotrichum* foi obtido na forma monospórica da Micoteca Anne-Lore Schroeder (código MANE) do Laboratório de Fitopatologia da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis-SC, Brasil) e da coleção micológica (Código C) do Laboratório de Fitopatologia da Universidad de la Republica (Montevideú, Uruguai).

Dentre os isolados brasileiros, 21 eram de *C. gloeosporioides*, quatro de *C. nymphaeae* (sinônimo *C. acutatum*) e um de *C. karstii*. Dentre os isolados de *C. gloeosporioides*, sete foram obtidos a partir de folhas com sintoma de Mancha Foliar de Glomerella (MFG) e o restante de frutos com podridão amarga (PA).

Dentre os isolados uruguaios, 11 eram de *C. gloeosporioides*, dois de *C. acutatum* e dois de *C. fragariae*; todos obtidos a partir de frutos com sintoma de PA.

Além dos isolados supra-citados, utilizaram-se os isolados BR1, de *C. gloeosporioides*, e BRCa1, BRCa22 e BRCa27 de *C. acutatum*, todos patogênicos à macieira. Esses isolados referenciais (Gonzáles, 2003; Gonzáles; Sutton & Correll 2006) foram generosamente cedidos pelo professor Turner B. Sutton da Universidade do Estado da Carolina do Norte (EUA), e repatriados com autorização do Ministério da Agricultura

Os isolados crescidos sobre fragmentos de papel filtro de 1cm² foram desidratados a vácuo em dessecador contendo sílica. Após remoção da umidade foram mantidos a -20°C, conforme metodologia adaptada de Gonzáles (2003). Para a recuperação dos isolados, os fragmentos de papel foram seccionados e depositados imediatamente sobre meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar – Himedia, Índia). Após 3-5 dias de incubação a 25°C e 12h de fotoperíodo, o micélio desenvolvido a partir dos fragmentos foi repicado para novas placas contendo BDA, para utilização nos ensaios descritos a seguir.

4.2. Determinação dos grupos de Compatibilidade Vegetativa

4.2.1. Obtenção de mutantes nit

Após crescimento dos isolados em meio de cultura BDA por dez dias, quatro discos de micélio com 3 mm de diâmetro foram transferidos para placas contendo BDA acrescido de KClO_3 . Para induzir a formação de setores dos isolados de *C. gloeosporioides*, *C. karstii* foi utilizada 1,5% de KClO_3 , enquanto que para *C. nymphaeae*, *C. fragariae* e *C. acutatum* 4,5%. (González; Sutton & Correll, 2006; Brooker; Leslie & Dickman, 1991). Para isolados que não geraram setores com KClO_3 nestas concentrações, foram testadas também as concentrações de 3,5%, e 6,5%. Inicialmente, utilizaram-se 10 placas para cada isolado, aumentando-se esta quantidade quando não se obtiveram setores, ou quando se desejou obter maior quantidade de mutantes nit.

Após um período de incubação de 20 dias a 25°C e 12h de fotoperíodo em meio contendo BDA+ KClO_3 , discos de 3 mm foram transferidos dos setores resistentes para meio mínimo (MM) contendo 2g de NaNO_3/L de meio basal (MB). O MB foi preparado de acordo com Puhalla (1985) e Correll; Klittch & Leslie (1987), com a seguinte composição: 30g de sacarose, 1g de KH_2PO_4 , 0,5g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5g de KCl , 10mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20g de ágar e 0,2mL de solução de micronutrientes para 1L de meio de cultura. A solução de micronutrientes foi preparada do seguinte modo: 5g de ácido cítrico, 5g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1g de $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,25g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 50mg de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 50mg de H_3BO_4 e 50mg de $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, para 95mL de água destilada (Puhalla, 1985; Correll; Klittch & Leslie, 1987). As placas foram mantidas a 25°C no escuro e após sete dias, o processo foi repetido sob as mesmas condições e pelo mesmo tempo de incubação. Toda colônia que apresentou crescimento selvagem, ou seja, com desenvolvimento de micélio aéreo denso, foi imediatamente descartada durante o processo. As que mantiveram crescimento ralo foram consideradas mutantes não utilizadores de nitrato (Puhalla, 1985, Correll; Klittch & Leslie, 1987; Brooker, Leslie & Dickman, 1991).

4.2.2. Classificação fenotípica dos mutantes nit

Para classificação fenotípica dos mutantes, selecionaram-se aqueles obtidos dos isolados MANE 38, MANE 40, MANE 57, MANE

70, MANE 72, MANE 91, MANE 143, MANE 147, C1, C5, C15, C38. A partir de culturas mutantes crescidas em MM por 5-7 dias, discos de 3 mm foram transferidos para placas contendo os seguintes meios de cultura: a) MB + nitrito de sódio (0,5 g/L) e b) MB + hipoxantina (0,2 g/L). Mutantes capazes de crescer com característica selvagem sobre ambos os meios de cultura foram considerados *nit1*. Os que apresentaram crescimento tipicamente selvagem em hipoxantina e ralo em nitrito foram classificados como mutantes *nit3*. Aqueles que cresceram ralos em ambos os meios, foram designados NitM (Garret & Amy, 1978; Correll; Klittich & Leslie, 1987; Brooker, Leslie & Dickman, 1991). Foram utilizadas três repetições, consistindo cada uma em duas placas; uma com MB + nitrito e outra com MB+ + hipoxantina.

4.2.3. Seleção e conservação de testers

Mutantes designados como testers são considerados aqueles com forte potencial para complementação, assim mais facilmente formando heterocárions quando pareados com os mutantes de outras classes fenotípicas (Correll, Klittich & Leslie, 1987). Para seleção dos testers dos isolados MANE 147, MANE 55, MANE 137, MANE 70, MANE 40, MANE 51, MANE 54, MANE 72, MANE 57, MANE 143, MANE 144, C1, C15, C21, C29, C38, BR1, BRCa1, BRCa22 e BRCa27, foi realizado o pareamento entre 12 mutantes do mesmo isolado em placas de 9 cm contendo MM. Para cada placa, foram transferidos três discos de 3 mm obtidos a partir de colônias mutantes crescidas em MM. Os discos foram dispostos a uma distância de 2 cm entre si, sendo que cada disco era correspondente a um dos 12 mutantes. Assim procedeu-se até que todas as combinações possíveis fossem contempladas, totalizando 27 placas, que permaneceram no escuro a 25°C por até três semanas. Foi adotado como tester o mutante que pareou positivamente com o maior número de mutantes dentro do mesmo isolado, sendo o mínimo três (González; Sutton & Correll, 2006). O pareamento positivo foi determinado pelo surgimento de micélio denso e aéreo nas zonas de intersecção entre as colônias, dentro do período analisado (Castro-Prado *et al.*, 2007; Hamada, 2005; González; Sutton & Correll, 2006). Os testers obtidos foram pareados entre si em placas de Petri contendo MM, transferindo-se um disco de 3 mm do tester de um isolado e outro do mutante complementar de outro para a mesma placa. Considerou-se mutante complementar outro

mutante qualquer que pareou positivamente com o tester do mesmo isolado (Gonzáles, 2003).

Foram pareados dois isolados por placa, que permaneceu novamente no escuro por três semanas a 25°C. Isolados que ao terem seus mutantes combinados parearam positivamente, foram considerados pertencentes ao mesmo GCV. Quando dois ou mais testers foram classificados como pertencentes ao mesmo GCV, selecionou-se aleatoriamente um deles como representativo. Este, bem como seu mutante complementar, foram preservados a 4 °C em papel filtro, dessecado como previamente descrito (Gonzáles, 2006).

4.2.4. Pareamentos entre isolados mutantes

Para verificação da compatibilidade entre isolados, utilizaram-se placas multipoços de poliestireno (Kasvi®, China) de 12 poços, contendo cada um 1,5 mL de MM. Imediatamente após a solidificação do meio de cultura, transferiu-se para cada poço um disco de 3 mm do tester e outro do mutante que desejava-se identificar o grupo de compatibilidade. Os discos foram dispostos em extremidades opostas dentro de cada poço e adotou-se como testemunha positiva a combinação entre o tester e seu mutante complementar. Utilizaram-se três repetições, constituindo-se cada uma de uma placa de cultura. As placas foram incubadas a 25°C no escuro por até três semanas. Durante este período, isolados que apresentaram micélio denso na região de intersecção, foram classificados no mesmo grupo de compatibilidade vegetativa (GCV) (Castro-Prado *et al.*, 2007; Hamada, 2005).

4.3. Monitoramento da formação de estruturas pré-infectivas, tubos de anastomose conidial e migração de DNA

4.3.1. Obtenção de conídios

Os conídios utilizados nos experimentos foram obtidos transferindo-se um disco de micélio com 8 mm de diâmetro para o centro de uma placa de Petri, contendo meio de cultura BDA. As culturas foram incubadas por 20 dias a 25°C e 12h de fotoperíodo. Posteriormente, adicionou-se água destilada estéril e os conídios foram removidos por fricção suave da superfície da colônia com alça de Drigalsky. A suspensão foi filtrada em dupla camada de gaze estéril (Araújo & Stadnik, 2011).

Para eliminação de possíveis inibidores e homogeneização da germinação, os conídios foram lavados por meio de duas centrifugações a 25°C e 8228 G por 15 minutos, sendo a solução sobrenadante descartada após cada centrifugação. A concentração de conídios na suspensão foi ajustada para 1×10^6 conídios/mL, com auxílio de câmara de contagem de esporos, tipo Neubauer.

4.3.2. Ensaios sobre lâminas de poliestireno

Para avaliação microscópica da formação de tubos de anastomose sobre lâminas de poliestireno, utilizaram-se os isolados MANE 147, MANE 55, MANE 70, MANE 40, MANE 143, MANE 144, C15, C21, C18, C29 e C38. Os ensaios foram realizados sobre lâminas translúcidas de poliestireno (Euro Signs®, São Paulo), de acordo com a metodologia modificada de Beleski-Carneiro, Sugui & Reicher (2002). Antes do seu uso, as lâminas com 0,8 mm de espessura e dimensões de 25x76mm foram cuidadosamente lavadas em água destilada estéril e esterilizadas com radiação UV por 1h.

Foram distribuídas três gotas de 10 µL de suspensão conidial sobre as lâminas, que foram mantidas no interior de placas de Petri de 9 mm de diâmetro, a 25°C, 12h de fotoperíodo e 100% de UR (umidade relativa). O desenvolvimento foi monitorado a cada duas horas de incubação (14-24h) (Ishikawa *et al.*, 2010), com uso de microscópio de luz (Alltion®, Guanxi, China) e de fluorescência (Nikon- Eclipse50i, Nikon®, Melville, NY), em aumento de 400-1000x. Para microscopia de luz, o fungo foi corado com 10µL de solução contendo Azul de Tripan. A solução de Azul de Tripan foi preparada pela adição de 0,02 g de corante Azul de Tripan (Sigma-Aldrich®, EUA) a uma solução contendo 10 g de fenol, 10 mL de glicerol, 10 mL de ácido lático e 10 mL de água destilada. Esta solução estoque foi diluída em etanol 96% (1:2 v/v) (Pogány *et al.*, 2009). Para microscopia de fluorescência adicionou-se 5µL da solução de KOH (10%) e 5 µL de Calcofluor White (Sigma-Aldrich®, EUA), segundo metodologia adaptada de Abdelrahman et al. (2006), Liu; Lin; Ko (2011); Roca *et al.*, (2003, 2004) (Figura 3).

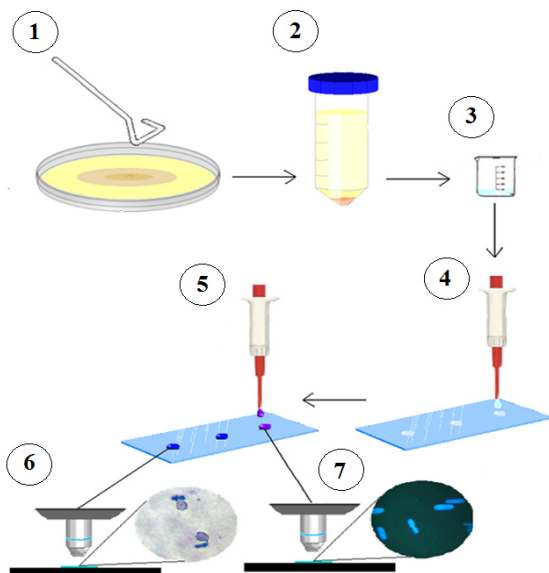


Figura 3- Metodologia para realização de ensaios de monitoramento da formação de tubos de anastomose conidial sobre lâminas de poliestireno, em microscopia de luz e de fluorescência. Legenda: 1) Remoção dos conídios das colônias de 20 dias cultivadas em BDA; 2) Lavagem dos conídios por centrifugação a 25°C e 8000 RPM; 3) Ajuste da concentração conidial a 1×10^6 conídios/mL; 4) Distribuição de gotas de 10µL; 5) Adição dos corantes Azul de Tripán e Calcofluor White; 6) Observação em microscopia de luz; 7) Observação em microscopia de fluorescência.

O filtro utilizado para visualização em fluorescência foi o de comprimento de onda de 380-420nm (Robinson & Sharon, 1999). Antes da sua utilização, ambos os corantes foram filtrados em membrana de celulose Sartorius®, de 0,2 µm de porosidade e permaneceram armazenados em temperatura ambiente no interior de frasco âmbar.

Para a avaliação, selecionou-se uma gota e quantificou-se em uma área de 1 mm² as seguintes variáveis: *i*) Densidade conidial; *ii*) Percentual de germinação; *iii*) percentual de conídios germinados com apressório e *iv*) com apressório melanizado. Considerou-se germinado o conídio que apresentava um tubo espesso, de comprimento igual ou maior que a

largura do conídio ou um apressório (Gonçalves & Stadnik, 2012). Quantificou-se também o total de TACs formados e o percentual de cada tipo de conexão. As conexões foram classificadas em: *i*) do tipo conídio-conídio (c-c); *ii*) conídio- tubo germinativo (c-t) e *iii*) tubo germinativo-tubo germinativo (t-t), como representado na Figura 3. Como TACs, foram considerados os tubos finos, curtos que se formavam a partir de tubos germinativos ou diretamente dos conídios, conectando estas estruturas (Read *et al.*, 2009).

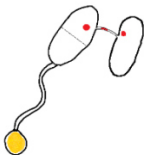
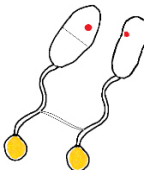

Imagem	Descrição
Tubo de anastomose conidial com ligação tipo conídio-conídio	
	Tubos finos e curtos que conectam dois conídios e emergem a partir destes.
Tubo de anastomose conidial com conexão do tipo tubo-tubo	
	Tubos finos e curtos que conectam dois tubos germinativos provenientes de conídios diferentes.
Tubo de anastomose conidial com conexão do tipo tubo-conídio	
	Tubos finos e curtos que conectam um conídio e um tubo germinativo emitido por outro conídio

Figura 4- Categorias para classificação de tubos de anastomose conidial (TAC), de acordo com o tipo de conexão estabelecida sobre lâminas de poliestireno e sobre folhas destacadas. Estruturas em amarelo ou vermelho representam apressório melanizado e núcleo, respectivamente.

Após 24h horas de incubação, observou-se a dinâmica nuclear na formação de tubos de anastomose sobre lâminas de poliestireno e a transferência de material genético através dos TACs. Para tanto, foram utilizados os corantes 2,4-diamidino-2-fenilindol (DAPI) e Iodeto de Propídio (Roca *et al.*, 2003, Roca *et al.*, 2004) (Sigma-Aldrich®, EUA), segundo a metodologia modificada de James *et al.* (1995). Para o DAPI, adicionou-se à cultura 20 µL de solução de tampão de fosfato de potássio 50 µM, pH 7,0, seguido pela adição de 10 µL de solução de DAPI (500µg/mL). A observação foi realizada sob o comprimento de onda de 380-420 nm. A solução de DAPI foi preparada em água destilada estéril e mantida no escuro a 4°C por no máximo 24h. A coloração com iodeto de propídio foi realizada adicionando-se à cultura de conídios 10µL de etanol 70% para fixação e, então, 10µL de solução de iodeto de propídio (10µg/mL). As preparações foram imediatamente observadas em microscópio de fluorescência com filtro no comprimento de onda de 510-560 nm (Robinson & Sharon, 1999). A solução de iodeto de propídio foi preparada em água destilada estéril e mantida no escuro a 4°C.

O delineamento experimental foi completamente casualizado com três repetições de cada tratamento. Cada repetição consistiu em uma lâmina de poliestireno contendo o inóculo.

4.3.3. Ensaios sobre folhas destacadas

As folhas utilizadas nos testes foram obtidas a partir plantas de macieira com 90 dias de idade e com 5 a 10 folhas. As plantas foram cultivadas segundo metodologia adaptada de Araújo & Stadnik (2013a). Para controle de oídio, uma solução de enxofre (3g/L) foi pulverizada a cada 20 dias com borrifador manual. As plantas foram cultivadas em casa-de-vegetação entre os meses de Abril e Julho de 2013, a 21,8°C±2,4.

Para observação da formação de tubos de anastomose, as últimas folhas completamente expandidas foram coletadas, lavadas em água destilada, para remoção de resíduos, e tiveram a extremidade do pecíolo envolvida com algodão embebido em água destilada.

Posteriormente, distribuíram-se sobre folhas destacadas de macieira duas gotas de 20µL de suspensão conidial na concentração de 1×10^6 conídios/mL dos isolados MANE 147, C15, C29 e MANE 143. O material foi incubado no interior de placas de Petri a 25°C, 100% de UR e fotoperíodo de 12h, segundo metodologia adaptada de Latunde-Dada *et al.* (1999). Após 48h de incubação, foram retirados dois discos foliares de

8 mm de diâmetro/folha (Araújo, Gonçalves & Stadnik 2014), reservando-se um para ser observado em microscopia ótica de campo claro e outro para microscopia de fluorescência. Foram utilizadas cinco repetições por tratamento, sendo que cada repetição constituiu-se de um disco foliar.

Os discos a serem observados em microscopia de luz foram primeiramente descoloridos. Isso foi feito segundo metodologia adaptada de Stadnik & Buchenauer (2000) e Araújo, Gonçalves & Stadnik (2014), assentando-se cuidadosamente os discos foliares com a parte adaxial voltada para cima sobre papel filtro previamente embebido em solução de cloral hidratado (2,5g/mL) (Pogány *et al.*, 2009), colocado no interior de placas de Petri. Após quatro dias de permanência no escuro em contato com a solução, os discos translúcidos foram transferidos para lâminas de vidro e observados em microscópio de luz e de fluorescência. Para o primeiro caso, adicionou-se 20 µL de solução de Azul de Tripán sobre sua superfície do disco foliar. Para observação em microscopia de fluorescência adicionou-se 10µL de KOH (10%) e 10µL de Calcofluor White. O filtro utilizado foi do comprimento de onda de 380-420 nm (Robinson & Sharon, 1999). Foram avaliadas microscopicamente (400x) as seguintes características: i) densidade conidial, ii) Percentual de germinação, iii) Número de total de TACs, iv) Percentual de TACs com conexão do tipo t-t, v) c-c e vi) t-c. Conídios germinados e TACs foram considerados aqueles com as características previamente descritas nos testes sobre lâminas de poliestireno (Figura 5).

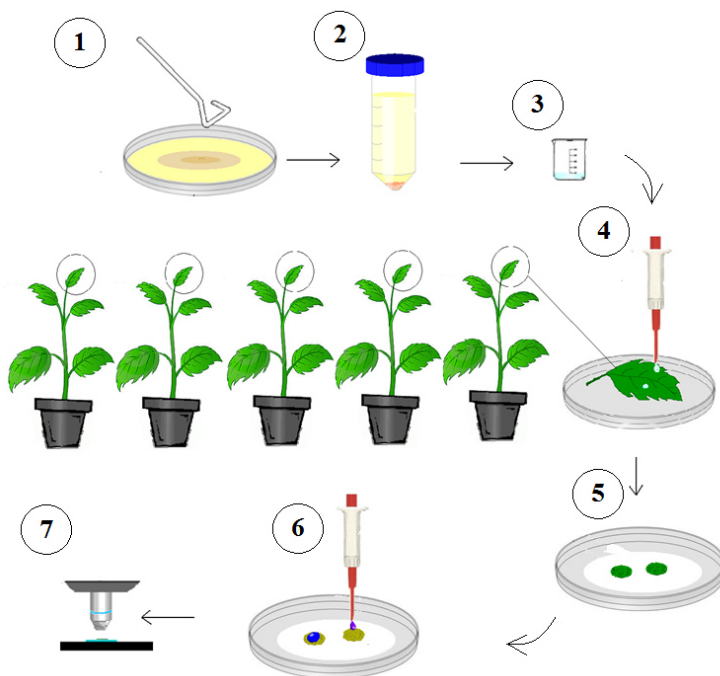


Figura 5- Metodologia para realização de ensaios de monitoramento da formação de tubos de anastomose conidial sobre folhas destacadas de macieira, em microscopia de luz e de fluorescência. Legenda: 1) Remoção dos conídios das colônias de 20 dias cultivadas em BDA; 2) Lavagem dos conídios por centrifugação a 25°C e 8000 RPM; 3) Ajuste da concentração conidial a 1×10^6 conídios/mL; 4) Distribuição de gotas de suspensão conidial sobre folhas destacadas de macieira; 5) Após incubação das folhas por 48h, remoção de dois discos foliares; 6) Adição dos corantes Azul de Tripán e Calcofluor White; 7) Observação em microscópio.

4.4. Delineamento experimental e Análise estatística

Com auxílio do programa computacional SisVar 5.0, determinou-se o momento de estabilização da germinação para cada isolado por análise de regressão, através da verificação da sobreposição dos intervalos de confiança (0,05%) em cada tempo. Para todas as variáveis, os dados obtidos no último momento de avaliação (24h) foram utilizados para elaboração de todas as tabelas apresentadas. Para verificar se as variâncias eram homogêneas para as densidades conidiais, realizou-se o teste de Levene ($p \geq 0,05$), com auxílio do programa STATISTICA 6.0.

Todos os experimentos foram repetidos duas vezes, com resultados similares, e os dados apresentados consistem na média entre os dados das duas repetições. Também, os pareamentos compatíveis obtidos nos testes de compatibilidade vegetativa foram repetidos e os resultados foram idênticos.

5. RESULTADOS

5.1. Determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa

5.1.1. Geração de mutantes nit

Todos os isolados geraram setores mutantes, em quantidades diferentes conforme o isolado. Em geral, isolados de *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* e *C. karstii* formaram setores em quantidades suficientes na concentração de 1,5% de KClO_3 (Figura 6). O mesmo não ocorreu para isolados de *C. nymphaeae* e *C. acutatum*, que produziam setores mutantes em baixas quantidades, sendo portanto necessário aumentar o número de placas para 30. Excepcionalmente para o isolado C37, mesmo utilizando-se 20 placas na concentração de 1,5% e 30 placas a 4,5% e a 6,5% de KClO_3 , não foi possível obter nenhum mutante a partir desse isolado. A quantidade de mutantes gerados de cada isolado encontram-se na Tabela 1.

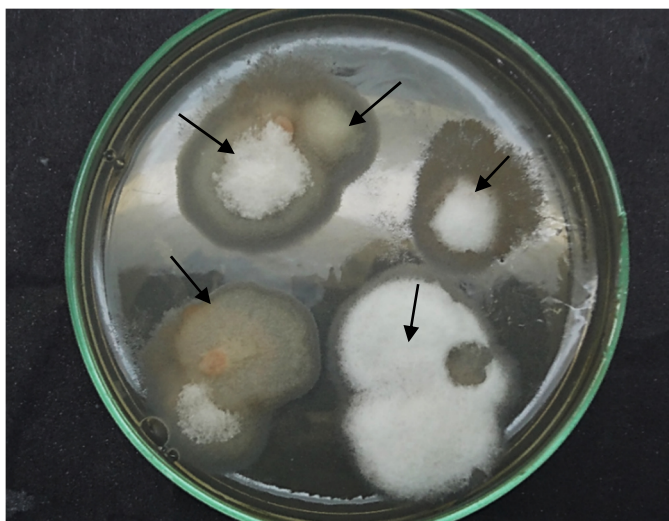


Figura 6- Desenvolvimento de setores resistentes a clorato formado por isolado MANE 72 em meio Batata Dextrose Ágar + KClO_3 , após 20 dias de incubação. Setas apontam os setores resistentes.

Tabela 1. Número mutantes não utilizadores de nitrato (*nit*) obtidos de isolados de *Colletotrichum* spp. brasileiros e uruguaios pertencentes aos complexos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* *Colletotrichum boninense* originados de de folhas e frutos de macieira.

Complexo	Espécie ^a	Isolados/ Número de mutantes <i>nit</i> ^b
<i>C. gloeosporioides</i>	<i>Cg</i>	MANE 34(1), MANE 35(3), MANE 36(3), MANE 37(1), MANE 38(9), MANE 39 (3), MANE 40 (21), MANE 41(1), MANE 51(18), MANE 54 (27), MANE 55(16), MANE 57(18), MANE 60(1), MANE 70(14), MANE 71(1), MANE 73(7), MANE 75 (4), MANE 76(5), MANE 90 (3), MANE 91 (5), MANE 147 (12), C1 (26), C2(4), C5(1), C8(3), C9(2), C10(4), C14(1), C20(6), C29(32), C38(50), Br1(20)*
	<i>Cf</i>	C15(16), C21(19), C37(0)
<i>C. acutatum</i>	<i>Cn</i>	MANE 137(15), MANE 139(1), MANE 143 (12), MANE 144(14)
	<i>Ca</i>	BrCa1(17)*, BrCa22(12)*, BrCa27(17)*, C18(12), C11(3)
<i>C. boninense</i>	<i>Ck</i>	MANE 72 (15)

^a *Cg*, *Cn*, *Ca*,, *Ck* representam *C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. acutatum*, *C. karstii*, respectivamente.

^b O número de mutantes obtidos por isolado encontra-se entre parênteses.

* Isolados utilizados e identificados por Gonzáles, Sutton & Correll (2006).

5.1.2. Classificação fenotípica

Não foi possível classificar fenotipicamente nenhum dos 194 mutantes dos 13 isolados testados, quanto ao locus de mutação envolvido na utilização de diferentes fontes de nitrogênio. Os mutantes apresentaram geralmente crescimento micelial semelhante em nitrito e hipoxantina. Além disso, diferenças no aspecto das colônias não se mantiveram em sucessivas repicagens, aproximadamente 6% dos mutantes foram incapazes de crescer em meio contendo nitrito.

5.1.3. Obtenção de testers

Os heterocárions foram visivelmente distinguíveis pela formação de um denso micélio aéreo na região de intersecção entre as colônias (Figura 7).

Após pareamentos de 12 mutantes do mesmo isolado entre si em MM, obteve-se pelo menos um tester para cada isolado, com exceção do MANE 147. Neste caso, nenhuma alteração na zona de intersecção ocorreu até três semanas de incubação, sendo este isolado classificado como auto-incompatível. Desta forma, foram obtidos inicialmente 20 testers. Pareando-se todos os testers entre si, foram obtidos 12 testers que representaram GCV distintos.

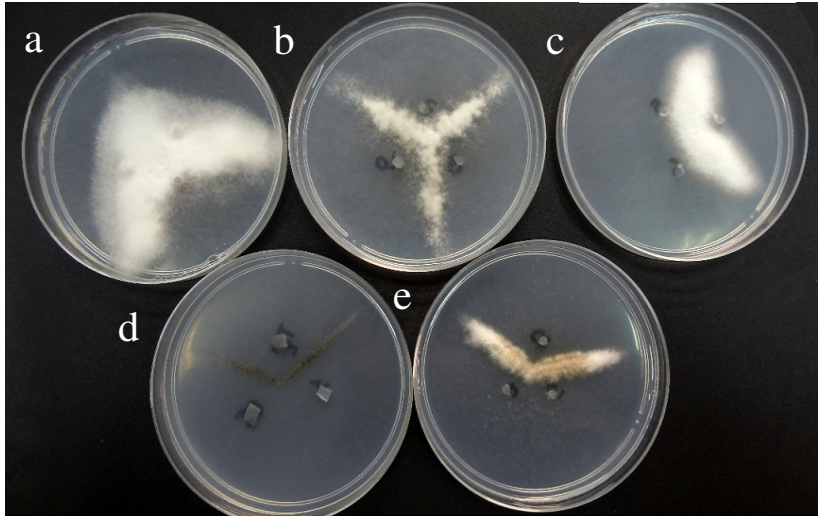


Figura 7- Pareamentos entre mutantes *nit* de *Colletrotrichum spp.* do mesmo isolado e desenvolvimento de micélio denso na zona de intersecção entre as colônias. a) MANE 51; b) C21; c) MANE 72; d) C29 e e) MANE 143.

5.1.4. Pareamentos entre isolados mutantes

Pela observação das placas multipoços durante três semanas de incubação, houve a formação de micélio aéreo denso na região entre os dois discos de micélio colocados nos poços, quando os isolados eram compatíveis (Figura 8).

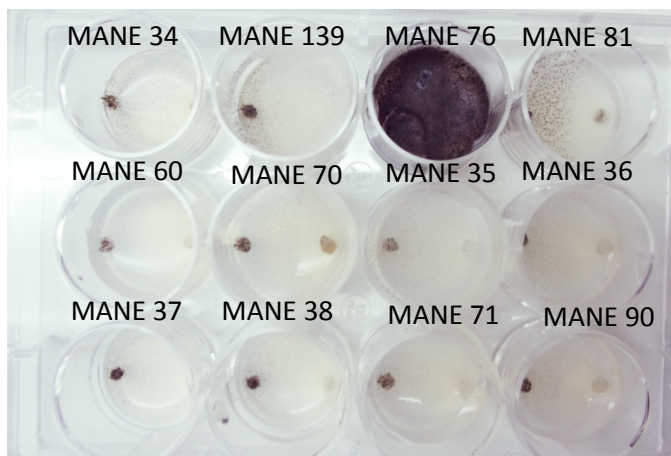
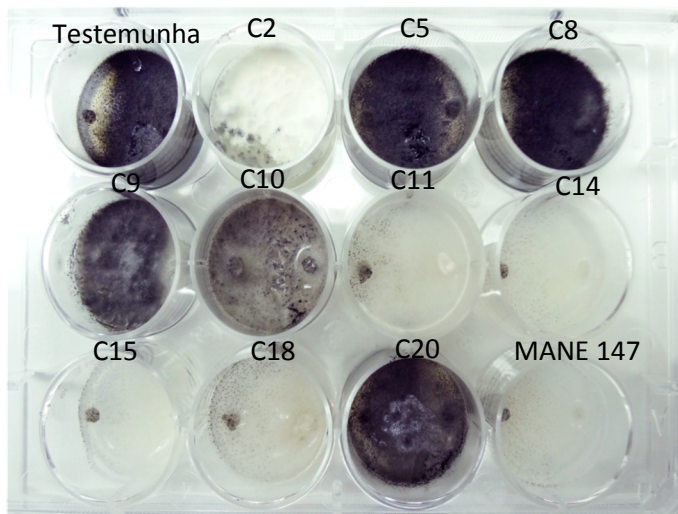


Figura 8- Pareamentos entre o tester do grupo de compatibilidade vegetativa 4 com mutantes *nit* de outros isolados de *Colletotrichum* spp., em placas multipoços contendo meio mínimo, aos 21 dias de incubação. A testemunha consiste no pareamento entre o tester e seu complementar. O crescimento de micélio aéreo denso indica a compatibilidade vegetativa.

Pareando-se os mutantes dos outros isolados com os 12 testers, foram identificados nove GCV para os isolados brasileiros (Tabela 2) e quatro para os uruguaiois (Tabela 3). Somente o isolado brasileiro MANE 76 encontrou-se num mesmo GCV (4) que os isolados uruguaiois, sendo este o único caso em que isolados dos dois países foram classificados no mesmo GCV.

Tabela 2. Grupos de compatibilidade vegetativa de mutantes *nit* de isolados brasileiros de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum karstii*, causadores de Mancha foliar de Glomerella e Podridão Amarga em macieira.

Código	Espécie ^a	Sintoma	Origem Geográfica	Coleção	GCV
MANE 34	<i>Cg</i>	PA	Vacaria-RS	UFSC	nd*
MANE 35	<i>Cg</i>	PA	São Joaquim-SC	UFSC	nd
MANE 36	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	1
MANE 37	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	nd
MANE 38	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	2
MANE 39	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	nd
MANE 40	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	2
MANE 41	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	nd
MANE 51	<i>Cg</i>	PA	Vacaria-RS	UFSC	3
MANE 54	<i>Cg</i>	PA	Vacaria-RS	UFSC	3
MANE 55	<i>Cg</i>	MFG	Vacaria-RS	UFSC	1
MANE 57	<i>Cg</i>	MFG	Vacaria – RS	UFSC	3
MANE 60	<i>Cg</i>	MFG	São Joaquim-SC	UFSC	2
MANE 70	<i>Cg</i>	MFG	São Joaquim-SC	UFSC	1
MANE 71	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	1
MANE 72	<i>Ck</i>	MFG	Caçador-SC	UFSC	5
MANE 73	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	nd
MANE 75	<i>Cg</i>	PA	S.F. de Paula-RS	UFSC	1
MANE 76	<i>Cg</i>	MFG	São Joaquim-SC	UFSC	4
MANE 90	<i>Cg</i>	PA	Fraiburgo-SC	UFSC	1
MANE 91	<i>Cg</i>	MFG	São Joaquim-SC	UFSC	nd
MANE 137	<i>Cn</i>	PA	São Joaquim-SC	UFSC	6
MANE 139	<i>Cn</i>	PA	São Joaquim-SC	UFSC	nd
MANE 143	<i>Cn</i>	PA	Urubici –SC	UFSC	7
MANE 144	<i>Cn</i>	PA	Urubici –SC	UFSC	6
MANE 147	<i>Cg</i>	MFG	Urubici –SC	UFSC	nd
BR1	<i>Cg</i>	MFG	EUA/SC-Brasil	NCSU	2
BRCa1	<i>Ca</i>	MFG	EUA/SC-Brasil	NCSU	8
BRCa22	<i>Ca</i>	PA	EUA/SC-Brasil	NCSU	9
BRCa27	<i>Ca</i>	PA	EUA/SC-Brasil	NCSU	9

*nd=Não definido

^a, *Cg*, *Cn*, *Ca*, *Ck* representam , *C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. acutatum*, *C. karstii*, respectivamente.

Tabela 3. Grupos de compatibilidade vegetativa de mutantes nit de isolados uruguaios de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum* e *Colletotrichum fragariae*, causadores de Podridão Amarga em macieira.

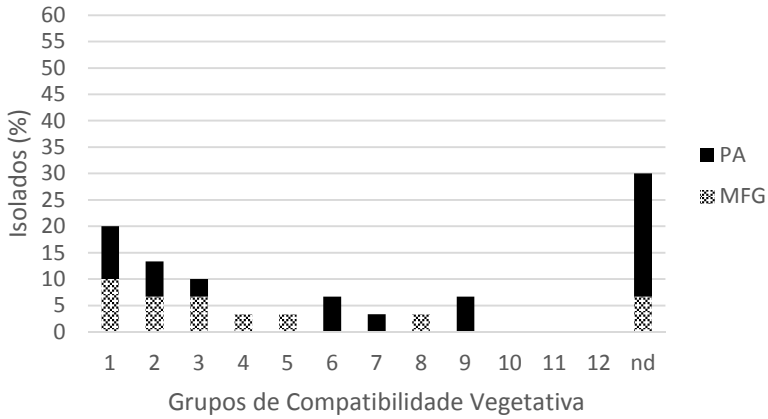
Código	Espécie ^a	Sintom ^a	Origem Geográfica	Coleção	GC V
C1	<i>Cg</i>	PA	Melilla-Montevidéo	Udelar	4
C2	<i>Cg</i>	PA	Melilla-Montevidéo	Udelar	4
C5	<i>Cg</i>	PA	Melilla-Montevidéo	Udelar	4
C8	<i>Cg</i>	PA	Melilla-Montevidéo	Udelar	4
C9	<i>Cg</i>	PA	Juanicó-Canelones	Udelar	4
C10	<i>Cg</i>	PA	Juanicó-Canelones	Udelar	4
C11	<i>Ca</i>	PA	Juanicó-Canelones	Udelar	nd*
C14	<i>Cg</i>	PA	Progreso-Canelones	Udelar	nd
C15	<i>Cf</i>	PA	Progreso-Canelones	Udelar	10
C18	<i>Ca</i>	PA	Juanicó-Canelones	Udelar	12
C20	<i>Cg</i>	PA	Progreso-Canelones	Udelar	4
C21	<i>Cf</i>	PA	Progreso-Canelones	Udelar	11
C29	<i>Cg</i>	PA	Las violetas-Canelones	Udelar	4
C38	<i>Cg</i>	PA	Progreso-Canelones	Udelar	4

*nd=Não definido

^a *Cg* , *Cf*, *Ca* representam *C. gloeosporioides*, *C. fragariae* e *C. acutatum*, respectivamente.

Não foram identificados isolados pertencentes aos grupos 10, 11, e 12 dentre os isolados brasileiros, nem aos grupos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 9 dentre os uruguaios. Os GCV 1 e 4 tiveram a maior porcentagem de representantes no Brasil e Uruguai, com cerca de 20 e 60% dos isolados de cada país, respectivamente (Figura 9).

A- Isolados brasileiros



B- Isolados uruguaiois

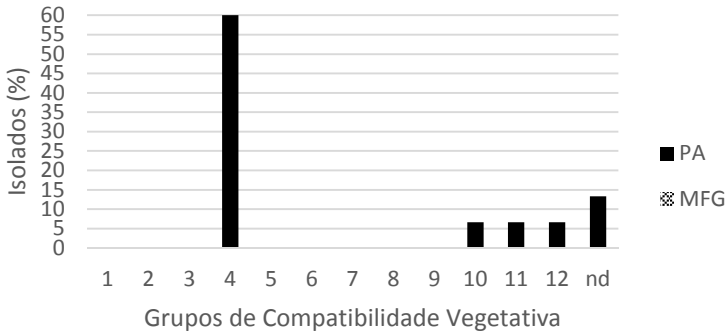


Figura 9- Distribuição percentual de isolados de *Colletotrichum* spp. causadores de Podridão Amarga (PA) e Mancha Foliar de Glomerella (MFG) nos grupos de compatibilidade vegetativa. A) isolados coletados no Brasil, e B) Uruguai. nd= Não definido.

Dentre os isolados brasileiros foram encontrados os grupos 1, 2, 4, 5 e 6 naqueles coletados em Santa Catarina, e os grupos 1 e 3 no Estado no Rio Grande do Sul. Quanto aos Estados (departamentos) uruguaios, identificou-se somente o grupo 4 no Departamento de Montevideo, e grupos 4, 10, 11 e 12 em Canelones (Tabelas 2 e 3).

Os grupos 6,7, 9, 10, 11 e 12 possuíram somente isolados causadores de PA, e os grupos 5 e 8 representantes causadores de MFG. Já os grupos os 1, 2, 3 e 4 apresentaram tanto isolados de PA quanto de MFG (Figura 9).

Não foi possível observar reação de compatibilidade vegetativa entre isolados de diferentes espécies ou diferentes complexos. No complexo *gloeosporioides* foram identificados 6 GCVs, sendo que dois continham somente um isolado de *C. fragariae* cada (GCVs 10 e 11). Cinco GCVs foram identificados dentro do Complexo *acutatum*, sendo que dois (GCVs 6 e 7) continham somente isolados de *C. nymphaeae* e três de *C. acutatum* (GCVs 8, 9 e 12). Destes últimos, um GCV possuía somente um isolado do Uruguai, enquanto que os outros dois os isolados enviados da NCSU. Apenas um isolado encontrou-se no GCV 5, sendo o único do Complexo *C. bonyense* analisado.

O isolado BR1 de *C. gloeosporioides* (Coleção NCSU) pertenceu ao GCV 2, juntamente com três outros isolados brasileiros. Os isolados de *C. acutatum* (BRCa1;22; 27;) não foram compatíveis com nenhum isolado brasileiro ou uruguaio. Destes, somente os isolados BrCa22 e BrCa27 foram inclusos no mesmo GCV (Tabelas 2 e 3).

5.2. Monitoramento do desenvolvimento de estruturas pré-infectivas, tubos de anastomose conidial e migração de DNA

5.2.1. Ensaios sobre lâminas de poliestireno

Mesmo pipetando-se o mesmo volume e concentração conidial para todos os isolados, houve variação na densidade de conídios (DC) sobre as lâminas de poliestireno (Tabela 4).

Tabela 4- Densidade (DC), tempo de máxima germinação (TMG) e percentual de germinação conidial (GC) e de formação de apressórios (FA) e apressórios melanizados (FAM) por isolados de *Colletotrichum* spp. incubados sobre lâminas de poliestireno.

Isolado	Espécie ^a	Tecido	DC (conídios /mm ²)	TMG ^b (h)	GC (%)	FA (%)	FAM (%)
MANE 40	<i>Cg</i>	Fruto	500 ±12 ^c	22	79,1	69,7	86,4
MANE 55	<i>Cg</i>	Folha	496 ±08	14	73,9	66,6	91,2
MANE 70	<i>Cg</i>	Folha	765 ±38	18	87,2	84,0	88,7
MANE 143	<i>Cn</i>	Fruto	734 ±37	22	23,3	11,8	9,9
MANE 144	<i>Cn</i>	Fruto	716±18	16	60,0	47,6	22,9
MANE 147	<i>Cg</i>	Folha	596 ±56	14	91,3	91,3	98,8
C15	<i>Cf</i>	Fruto	833 ±131	24	16,6	16,6	98,0
C18	<i>Ca</i>	Fruto	700 ±18	22	8,8	1,1	0,0
C21	<i>Cf</i>	Fruto	625 ±68	24	27,2	25,4	96,8
C29	<i>Cg</i>	Fruto	541 ±24	22	31,0	15,1	32,5
C38	<i>Cg</i>	Fruto	595 ±56	16	23,5	11,0	43,2

^a*Cg*, *Cn*, *Cf*, *Ca* representam *C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. fragariae*, *C. acutatum*, respectivamente.

^b Definido por análise de regressão

^c Desvio padrão

O tempo de máxima germinação conidial (TMG) bem como o percentual de germinação (GC) foram variáveis entre os isolados testados, especialmente entre aqueles obtidos a partir de fruto. Entretanto, os obtidos de folha apresentaram uma rápida e uniforme emissão de tubos germinativos e formação de apressórios melanizados (FAM). Esses atingiram o máximo percentual de germinação em até 18h de incubação. Já os isolados de fruto, com exceção do MANE 40, apresentaram menores percentuais de germinação e menor formação de apressórios (FA).

Isolados de *C. nymphaeae* e *C. gloeosporioides* obtidos de fruto, com exceção do MANE 40, formaram apressórios melanizados em menores quantidades em relação ao número de apressórios emitidos. Conídios de isolados de *C. gloeosporioides* originados de folha e de *C. fragariae* tiveram pelo menos 88,7% (MANE 70) dos apressórios melanizados (Tabela 4).

Nenhum isolado de folha ou de *C. fragariae* formou tubos de anastomose conidial até às 24h de incubação. Somente isolados de fruto de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. nymphaeae* formaram estas estruturas durante este período (Tabela 5).

Tabela 5- Classificação dos tipos de conexão e total de tubos de anastomose conidial (TACs) formados após 24h de incubação de conídios de *Colletotrichum* spp. sobre lâminas de poliestireno.

Isolado	Espécie ^a	Tecido	t-t ^b (tubos/m m ²)	c-c ^c (tubos/mm ²)	t-c ^d (tubos/ mm ²)	TACs totais (fusões/mm ²)
MANE 40	<i>Cg</i>	fruto	6,6b	12,6 e	13,3 c	32,6 d
MANE 55	<i>Cg</i>	folha	0	0	0	0
MANE 70	<i>Cg</i>	folha	0	0	0	0
MANE 143	<i>Cn</i>	fruto	6,0 b	131,3 a	22,7 b	160,3 a
MANE 144	<i>Cn</i>	fruto	6,7 b	106,7 b	42,0 a	155,4 a
MANE 147	<i>Cg</i>	folha	0	0	0	0
C15	<i>Cf</i>	fruto	0	0	0	0
C18	<i>Ca</i>	fruto	0,0 c	82,6 c	12,0 c	94,6b
C21	<i>Cf</i>	fruto	0,0	0	0	0
C29	<i>Cg</i>	fruto	12,7 ^a	36,7 d	40,7 a	90,1 b
C38	<i>Cg</i>	fruto	9,3 ^a	26,7 d	24,7 b	60,7 c

^a Abreviações: *Cg*, *Cn*, *Cf* e *Ca* para *C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. fragariae* e *C. acutatum*, respectivamente.

^{b, c, d}t-t, c-c, t-c, referem-se as conexões do tipo tubo-tubo, conídio-conídio e tubo-conídio, respectivamente.

^e Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$).

Os isolados que formaram o maior número de TACs totais foram o MANE 143 e MANE 144 de *C. nymphæae*. Nestes, a presença desses tubos foi cerca de 80 % mais frequente que nos demais isolados.

A conexão do tipo t-t foi a menos frequente nos seis isolados estudados, variando de 0 a 20% do número total de conexões. Os isolados C29 e C38 de *C. gloeosporioides* foram os que mais formaram este tipo de conexão, com valores até 41,7 e 65,3 % superiores aos outros isolados, respectivamente. Percentualmente, todos os isolados de *C. gloeosporioides*, inclusive o MANE 40, produziram TACs com este tipo de conexão, sendo mais frequente que nos demais isolados (Tabela 5 e Figura 10).

Para todos os isolados do Complexo *acutatum* testados, o número de conexões do tipo c-c foi a mais frequente (Tabela 5, Figura 8, Figura 10e e 10f). Todos os isolados deste complexo formaram conexões do tipo c-c com valores semelhantes (Figura 10).

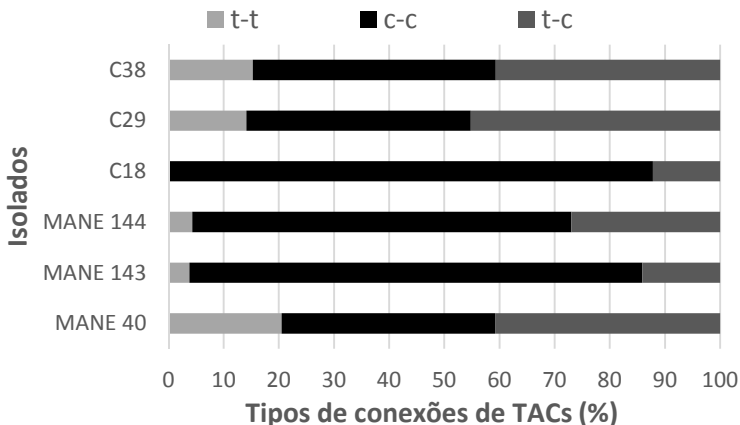


Figura 10- Percentual de conexões do tipo tubo-tubo (t-t), conídio-conídio (c-c) e tubo-conídio (t-c) de tubos de anastomose conidial (TACs) formados por conídios de *Colletotrichum* spp. da macieira, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

As conexões do tipo t-c foram formadas em número variado conforme o isolado, sobretudo para o MANE 40, C29 e C38 de *C. gloeosporioides*. Nestes, estas conexões superaram as do tipo t-t em 40, 69 e 37%, respectivamente. As conexões do tipo t-c não se diferenciaram da categoria c-c na mesma magnitude que da t-t. O número de conexões tipo t-c foi 9,4% menor que do tipo c-c para o isolado C38 e 19,5 e 9,8% maior para o MANE 40 e C29 respectivamente. Para todos os isolados do complexo *acutatum*, esta categoria foi proporcionalmente intermediária às outras duas (Tabela 5).

Os TACs do tipo t-c foram mais frequentes nos isolados MANE 40, C29 e C38 de *C. gloeosporioides*, os mesmos que apresentaram maior percentual de conexões do tipo t-t (Figura 9, Figura 11a, 11b e 11, d). Isso também é demonstrado pela elevada correlação positiva entre estas duas categorias (Tabela 6).

Tabela 6- Correlação entre densidade (DC), percentual de germinação (GC), tempo de máxima germinação (TMG), formação de apressórios (FA), apressórios melanizados (FAM), total de tubos de anastomose conidial (TACs) e tipos de conexões formadas por isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum acutatum* da macieira sobre lâminas de poliestireno.

Variáveis	DC ^b	TGM ^a	GC	FA	FAM	t-t	c-c	t-c	TAC total
TAC total	0,20	0,16	-0,29	-0,57	-0,92*	0,57	0,97*	0,86*	
t-c	-0,07	0,05	-0,14	-0,47	-0,77*	0,87*	0,70		
c-c	0,31	0,20	-0,31	-0,55	-0,89*	0,36			
t-t	-0,34	0,07	-0,06	-0,37	-0,51				
FAM	-0,14	-0,18	0,49	0,75*					
FA	-0,31	-0,58	0,99*						
GC	-0,37	-0,58							
TGM	0,33								
DC									

*Correlação significativa segundo teste t ($p \geq 0,1$).

^{a,b,c} Tubos de anastomose conidial com conexão do tipo tubo-tubo, conídio-conídio, tubo-conídio, respectivamente.

Os isolados que não apresentaram formação de tubos de anastomose, como os de *C. fragariae* e *C. gloeosporioides* de folha, apresentaram elevado percentual de formação de apressórios melanizados e crescimento individualizado (Tabela 4 e Figura 13). Foram encontradas correlações negativas altamente significativas entre o percentual de FAM e o número de TACs total, as conexões do tipo c-c e c-t (Tabela 6).

Não se observou correlação significativa entre a densidade de confídios e nenhum dos outros fatores analisados. O percentual de germinação correlacionou-se positivamente com o percentual de formação de apressórios, mas não com o de apressórios melanizados. Já o percentual de apressórios formados correlacionou-se positivamente com o percentual de apressórios melanizados. Houve alta correlação positiva entre o número de tubos de anastomose totais e as conexões do tipo c-c e t-c, e, mas não com t-t (Tabela 6).

Os isolados C29, MANE 144, MANE 143 e C18 emitiram tubos de anastomose a partir de 14h de incubação. Os isolados C38 e MANE 40 produziram tubos de anastomose somente após as 16h de incubação. Esses isolados apresentaram também menor quantidade de tubos de anastomose às 24h, em relação aos isolados que iniciaram anteriormente sua emissão (Tabela 4 e Figura 10 e 11).

Para os isolados de *C. acutatum* e *C. nymphaeae*, a quantidade de conexões do tipo c-c destacou-se em relação às outras categorias durante todos os momentos de avaliação. O mesmo não ocorreu com isolados de *C. gloeosporioides*, nos quais a quantidade de conexões do tipo c-c e t-c foram semelhantes e mais numerosas que a categoria t-t, ao longo das horas de incubação.

Conexões do tipo t-t estavam presentes desde as 14h de incubação para todos os isolados, exceto para o MANE 143, que surgiu apenas às 24h. Para o isolado C18, este tipo de conexão não foi detectado em nenhum dos momentos de avaliação.

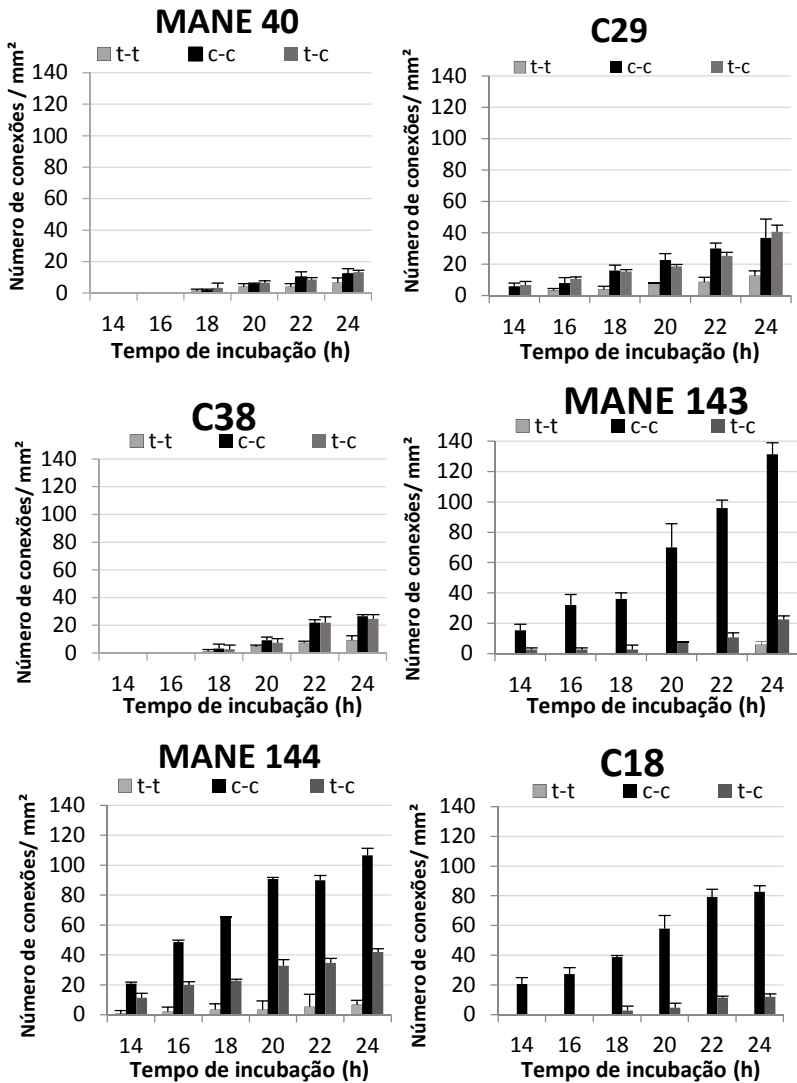


Figura 11- Desenvolvimento dos diferentes tipos de conexões de tubos de anastomose (t-t, c-c, t-c) de *Coletotrichum* spp. ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno. t-t= Conexão do tipo tubo-tubo; c-c= conídio-conídio e t-c= tubo-conídio.

Os corantes iodeto de propídio e DAPI tiveram alta afinidade pelo material genético dos isolados de *Colletotrichum* testados, corando-o distintamente sobre lâminas de poliestireno. Foi possível observar para ambos os isolados testados nas duas colorações que conídios que não apresentaram nenhum desenvolvimento permaneceram com somente um núcleo amplo, arredondado e localizado na região central do conídio. Observou-se uma passagem de material genético de tamanho e número variados através dos TACs. Em alguns tubos, inúmeros núcleos foram encontrados. Alguns conídios que formaram TACs apareciam com mais de um material genético, as vezes de forma mais dispersa, sem delimitações claras. Alguns conídios que formavam os agrupamentos apresentavam-se sem material genético no momento da avaliação (Figura 12c, e, f).

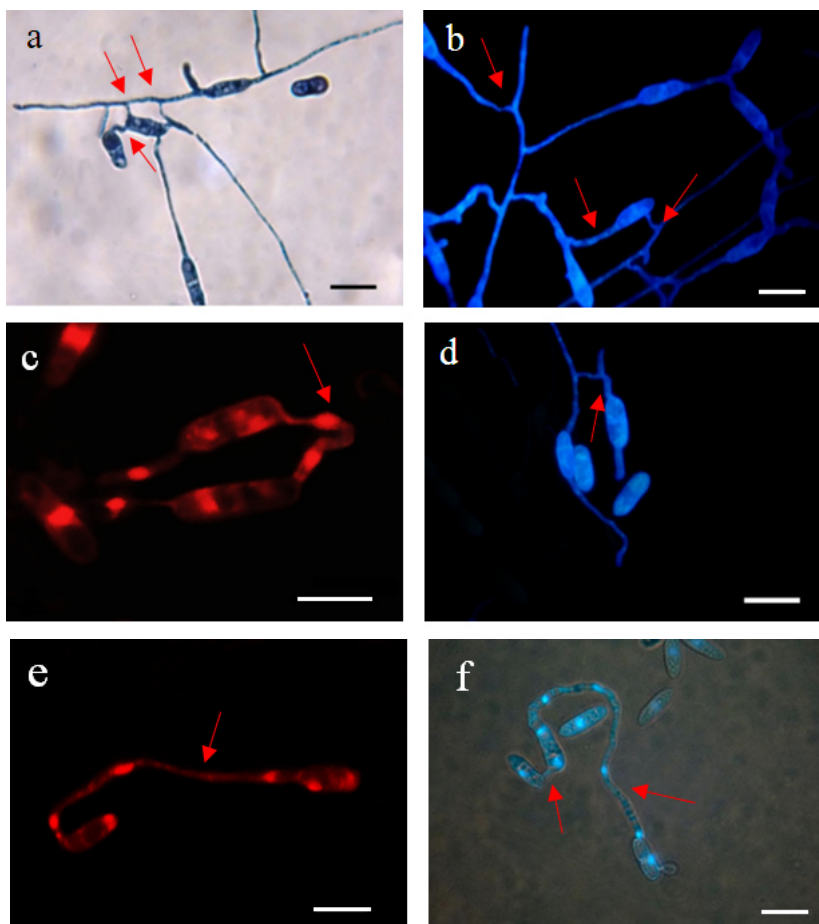


Figura 12- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial sobre lâminas de poliestireno a) Isolado C29 em microscopia de luz e coloração com Azul de Tripán; b) Isolado C29 em microscopia de fluorescência e coloração com Calcofluor White; c) Isolado C29 em microscopia de fluorescência e coloração do material genético com Iodeto de Propídio; d) Isolado C38 sob microscopia de fluorescência corado com Calcofluor White; e) Isolado MANE 143 em microscopia de fluorescência e coloração do material genético com Iodeto de Propídio; f) Isolado MANE 143 em microscopia de fluorescência e coloração do material genético com DAPI. Barra=10 μ m. Setas indicam os TACs o asterisco um apressório hialino.

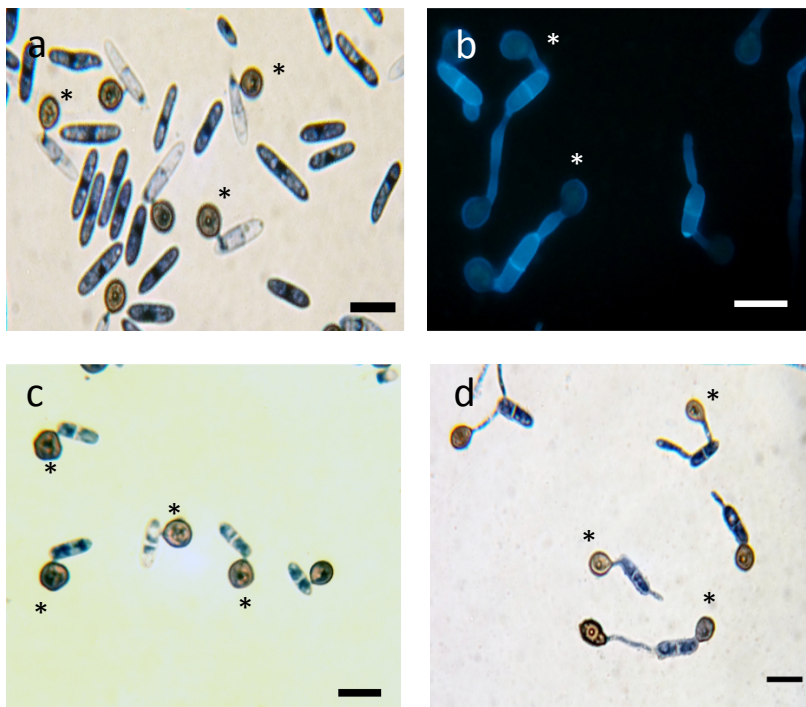


Figura 13- Desenvolvimento de estruturas pré-infectivas por conídios de isolados de *Colletotrichum fragariae* (a) e *Colletotrichum gloeosporioides* (b, c, d) visualizados por microscopia de luz com adição de Azul de Tripán (a, c, d) e microscopia de fluorescência com Calcofluor White (b), após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno. a, b, c e d mostram o desenvolvimento de tubos germinativos e apressórios melanizados por conídios dos isolados C15, MANE 70, MANE 147 e MANE 55, respectivamente. Barra= 10 µm. Asterísticos representam apressórios melanizados

5.2.2. Ensaio sobre folhas destacadas

Sobre a superfície foliar, os isolados MANE 147 e C15 formaram apressórios melanizados, mas nenhum TAC após 48h de incubação. O isolado MANE 143 emitiu muitos TACs, com evidente destaque para o tipo de conexão c-c. Sobre folhas destacadas, o isolado C29 formou mais frequentemente TACs da categoria c-c, (Tabela 7 e Figura 14).

Tabela 7- Densidade (DC), percentual de germinação (GC), total de tubos de anastomose conidiais (TACs) e diferentes tipos de conexões formadas por conídios de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum nymphaeae* e *Colletotrichum fragariae* incubados por 48h sobre folhas de macieira.

Variáveis	Espécies			
	<i>Cg</i>		<i>Cn</i>	<i>Cf</i>
	C29	MANE 147	MANE 143	C15
DC (conídios/mm ²)	86,7	72,1	79,7	67,5
GC (%)	13,2	63,7	12,2	75,2
	TACs			
t-t (tubos/mm ²)	45,1a ^b	0	11,3b	0
c-c (tubos/mm ²)	216,5a	0	229,8 ^a	0
t-c (tubos/mm ²)	60,4a	0	42,4b	0
TAC total (tubos/mm ²)	322a	0	283,3 ^a	0

^a Abreviações: *Cg*, *Cn*, *Cf* para *C. gloeosporioides*, *C. nymphaeae*, *C. fragariae*, respectivamente.

^b Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$)

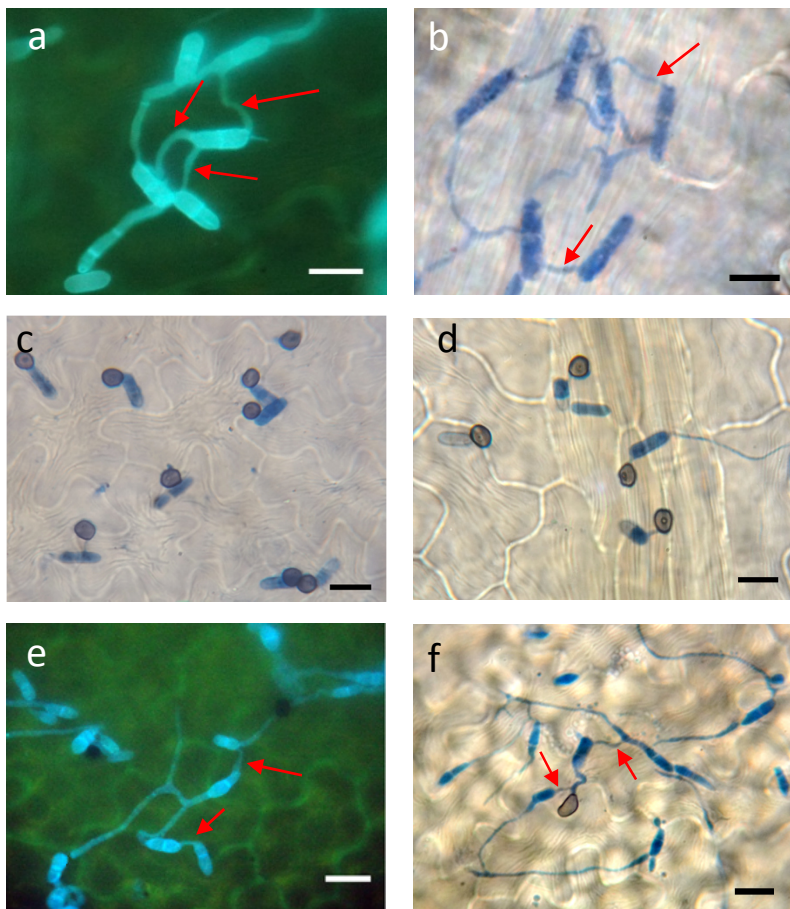


Figura 14- Desenvolvimento de estruturas pré-infectivas e tubos de anastomose por conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* (a, b, c), *Colettotrichum fragariae* (d) e *Colletotrichum nymphaeae* (e, f), visualizados em microscopia de luz com adição de Azul de Tripán (b, c, d, e) e microscopia de fluorescência com Calcofluor White (a, d), após 48h de incubação sobre folhas destacadas de macieira. a e b) Isolado C29 com formação de tubos de anastomose conidial; c e d) Isolados MANE 147 e C15, respectivamente, sem formação de tubos de anastomose conidial e desenvolvimento de apressórios melanizados e; e e f) Isolado MANE 143 com formação de tubos de anastomose conidial. Setas vermelhas representam tubos de anastomose conidiais.

6. DISCUSSÃO

Geralmente, isolados de *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* e *C. fragariae* da macieira formaram setores resistentes ao clorato de potássio (1,5%). Isto está em concordância com Hamada (2005), Gonzáles; Sutton & Correll (2006) e Freeman & Katan (1997). Por outro lado, observou-se uma menor frequência na formação de setores resistentes ao clorato para os isolados de *C. acutatum*. Mesmo quando se utilizou uma maior concentração de clorato (4,5%) no meio não foi possível aumentar a frequência de mutantes. A determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa utilizando o agente mutagênico clorato de potássio e o pareamento em Meio Mínimo também vem sendo aplicada com sucesso para espécies de *Fusarium* (Puhalla, 1985).

Aparentemente, diferenças na sensibilidade ao agente mutagênico clorato podem ser encontradas não somente entre espécies de *Colletotrichum*, mas também entre isolados de uma mesma espécie. Assim, por exemplo, o isolado C37 (*C. fragariae*) não produziu setores ou mutantes *nit*, mesmo em elevadas concentrações de clorato no meio de cultura. Isso também foi relatado para *Aspergillus flavus* e *Verticillium dahliae* do pistache e do algodão, nos quais 14, 4 e 3% dos isolados testados não formaram setores, respectivamente (Bayman & Cotty, 1990; Hadizadeh & Banihashemi, 2007). A tendência à formação de setores em clorato é hereditária (Klittich, Correll & Leslie, 1988), pode haver isolados com menor sensibilidade a agentes mutagênicos. Também, é possível que a cultura monospórica possa ter selecionado um conídio que eventualmente perdeu esta resistência por mutações, assim não transferindo-a para as células vegetativas do mesmo.

Para nenhum dos mutantes testados foi possível realizar a classificação fenotípica utilizando as diferentes fontes de nitrogênio, embora estes fossem claramente deficientes na utilização de nitrato, devido seu crescimento ralo em MM. Existem divergências na literatura acerca deste resultado, pois alguns autores como Beaver, Olsen & Parkes (1995), Brooker, Leslie & Dickman (1991) e Lardner *et al.* (1999) obtiveram sucesso na classificação fenotípica de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* da macieira. Por outro lado, Freeman & Katan (1997) não conseguiram classificar fenotipicamente utilizando esta técnica, isolado de *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. fragariae* do morangueiro. Hamada (2005) não produziu testers, pareando isolados mutantes quaisquer entre si e Gonzáles, Sutton & Correll (2006) utilizaram uma

metodologia similar a utilizada no presente trabalho. É possível que a mutação relacionada ao metabolismo do nitrato tenha ocorrido em outros *loci* que codificam para produção de outras enzimas envolvidas nesta via, impedindo a assimilação adequada do nitrato. No caso de *Aspergillus*, existem 10 *loci* indetificados onde a mutação pode ocorrer. Em *N. crassa*, há 8 *loci* identificados (Marzluf, 1961). Entretanto, o uso de nitrito e hipoxantina como fonte de nitrogênio identificam apenas os mutantes *NitM*, *nit1*, *nit2* e *nit3* (Brooker, Leslie & Dickman, 1991). Assim, é possível também que tenham sido produzidos 100% de mutantes *nit1* para os isolados testados, porém é pouco provável que as quatro espécies testadas apresentassem exatamente o mesmo comportamento. Embora a proporção de mutantes *nit1* seja muito superior à outros *loci*, (Correll; Klittich & Leslie, 1987), para *C. gloeosporioides* da macieira e *C. fragariae* do morangueiro, foram encontrados os mutantes na frequência fenotípica de 6,5:2,5:1 e 7:2,5:0 (*nit1:nit3:NitM*), respectivamente (Brooker; Leslie & Dickman, 1991). Portanto, isto descartaria, na maioria dos casos, a hipótese de não terem sido testados mutantes em quantidade suficientes para que as outras classes fossem encontradas.

O método adaptado de Gonzáles (2003) para obtenção de testers foi eficiente, designando GCVs de forma estável e reproduzível. Uma evidência disto é que mesmo após a permanência dos isolados BR1, BRCa1, BRCa22 e BRCa27 a -20°C por 12 anos, estes produziram testers e foram enquadrados em GCVs, conforme descrito por aqueles autores.

Geralmente, isolados de uma mesma espécie originados de regiões isoladas geograficamente, pertencem a GCVs distintos. Sharif; Zare & e Rees-George (2008) classificaram em grupos diferentes os isolados de *Fusarium solani* da batata provenientes do Irã e da Nova Zelândia. No caso de *Colletotrichum* spp. da macieira, isolados do Brasil e EUA foram classificados em GCVs distintos por Gonzáles, Sutton & Correll (2006). De forma semelhante, Varzea, Rodrigues e Lewis (2002) classificaram isolados de *Colletotrichum kahawe* do cafeeiro coletados em países vizinhos da África central pertenciam aos mesmos GCVs, mas eram distintos daqueles coletados na China. No entanto, isolados de diferentes continentes podem, algumas vezes, pertencer ao mesmo GCV. Por exemplo, isolados de *Giberella pulicaris* da batata coletados na Austrália e Inglaterra foram classificados no mesmo GCV (Desjardins, 1995). Também, isolados australianos, europeus e norte-americanos de

Colletotrichum coccodes da batata foram equadrados no mesmo GCV (Ben-Daniel *et al.*, 2010).

Distâncias mais curtas, onde um hospedeiro cresce de forma semi-contínua numa região, são geralmente insuficientes para criar subpopulações de fungos distintas. Por isso, isolados de *Colletotrichum* ssp. com origem nos estados vizinhos da Estado da Carolina do Norte e Georgia apresentaram-se no mesmo grupo, assim como um isolado do Tennessee foi classificado no mesmo grupo que isolados da Georgia (Gonzáles, Sutton & Correll, 2006). O mesmo ocorreu no presente trabalho, em que isolados provenientes do RS pertenceram ao mesmo GCV que isolados coletados em SC. Como esperado isolados coletados no Departamento de Canelones perteceram ao mesmo GCV que os originários de Montevideú. Há uma vasta área que compreende grande parte do Estado do Rio Grande do Sul e o Uruguai onde a macieira não é cultivada. Esta barreira física apresentada na forma de separação geográfica pode ter sido o suficiente para criar populações distintas de *Colletotrichum*, pela impossibilidade de recombinação e troca de material genético por vias sexuais e parassexuais.

Uma etapa essencial para a determinação de GCVs é a seleção de um “tester forte” (Correll, Puhalla & Schneider, 1986a), do contrário pode-se obter resultados falso- negativos (Correll, Klittich & Leslie, 1987). Quando foram utilizados como tester os mutantes *nit1* e *nit3* do isolado identificador da raça 2, um total de 64% dos isolados de *F. oxysporum* f. sp. *apii* testados não foram compatíveis com o identificador. Porém, todos os mutantes dos isolados testados foram compatíveis com um mutante extra, designado *nitC*, bem como os próprios *nit1* e *nit3* do mesmo isolado. Posteriormente, este mutante *nitC* foi denominado *NitM* (Correll, Puhalla & Schneider, 1986a). Este é tido como o mais confiável para ser usado como tester.

No presente trabalho, isolados de diferentes complexos ou espécies jamais perteceram ao mesmo GCV. Isso está de acordo com Gonzáles, Sutton & Correll (2006) estudando *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* da macieira e com Varzea, Rodrigues e Lewis (2002) para *C. gloeosporioides*, *C. acutatum* e *C. kahawe* do cafeeiro.

O isolado BR1, coletado no Brasil em 2001 foi compatível com outros três isolados brasileiros da coleção da UFSC. Isso denota que parte da população de *C. gloeosporioides* permaneceu inalterada em relação à compatibilidade vegetativa. Por outro lado, foram encontrados cinco GCVs de *C. gloeosporioides*, enquanto que Gonzáles, Sutton & Correll

(2006) encontraram somente dois. Deste modo, pode-se concluir que há uma maior variabilidade genética na população desta espécie no sul do país que no momento da realização do trabalho daqueles autores. Para isolados do Complexo *C. acutatum* foram identificados GCVs distintos daqueles de Gonzáles, Sutton & Correll (2006). Isso sugere que os isolados atuais constituem uma população geneticamente diferente da população de 2001. Porém, seria necessário testar maior número de isolados desse complexo para que isso fosse ou não confirmado.

A formação de tubos de anastomose é essencial para formação de heterocárions, possibilitando a fusão das hifas de isolados diferentes (Jacobson & Gordon, 1988; Correll, Puhalla & Schneider, 1986b; Correll, Klittich & Leslie, 1987). Tubos de anastomose permitem a troca de material genético e citoplasmático (Roca *et al.* 2003; Roca *et al.*, 2004). Assim, GCVs subdividem populações que podem trocar material genético (Brooker, Leslie & Dickman, 1991). Como três dos doze GCVs continham isolados tanto de fruto quanto de folha, provavelmente isolados de MFG podem trocar material genético com isolados causadores de PA. Isto está de acordo com Leslie(1993), que afirma que isolados fisiologicamente distintos podem se fundir assexuadamente, formando heterocárions estáveis. Desta forma, é possível que através do ciclo parassexual e intercâmbio genético, isolados que antes não possuíam a capacidade de infectar folhas, passem a adquirí-la. Também, é possível que a partir da combinação de isolados de PA e MFG gere novos isolados com dupla aptidão infectiva, originando populações de *Colletotrichum* spp. que podem provocar doença em folhas e frutos.

Visto que a disseminação do inóculo se dá pela água da chuva (Katsurayama & Boneti, 2009), a mesma água que caiu sobre a lesão na folha pode escorrer para os frutos e vice-versa, carregando conídios de um órgão para o outro. Ainda que conídios provenientes da folha não tenham capacidade de gerar PA estando sobre o fruto, ou mesmo o contrário, estando na presença de outros conídios que possuem esta capacidade, podem formar tubos de anastomose e heterocárions estáveis, que poderia resultar em maior variabilidade do fungo. Como a maior variabilidade, novos isolados mais aptos e agressivos podem surgir, além daqueles que adquiriram capacidade de infectar cultivares que anteriormente eram resistentes (Jiménes-Gasco *et al.*, 2004).

A fusão dos tubos de anastomose é o primeiro evento que possibilita ou não a formação dos heterocárions e troca de material genético (Jacobson & Gordon, 1988), pois a reação de incompatibilidade

pode se dar inicialmente a nível de parede celular. Mutantes de isolados de *V. dahliae* tidos como incompatíveis, quando tiveram somente seu protoplasto fundido foram capazes de formar herócárons (Typas, 1983). No presente trabalho esta incompatibilidade não foi observada, pois os TACs formados apresentavam-se totalmente fundidos.

A formação de TACs parece ser um fenômeno comum a espécies de *Colletotrichum* em diferentes hospedeiros, tais como *C. lindemuthianum* do feijoeiro (Roca *et al.*, 2003; Roca, *et al.*, 2004; Roca, Read & Wheals, 2005, Ishikawa *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2012) e *C. gossypii* do algodão (Roca, *et al.*, 2004), *C. acutatum* da amêndoa (Wharton & Diéguez-Uribeondo, 2004) e *C. gloeosporioides* do cafeeiro (Roca *et al.* 2003), e uma espécie ainda não identificada de *Colletotrichum* do feijão caupí (Latunde-Dada *et al.*, 1999).

A formação de TACs parece estar intimamente relacionada a características intrínsecas do próprio isolado, tanto para o número de tubos formados, quanto o tipo de conexão. Ishikawa *et al.* (2010) e Araújo & Stadnik (2013b) também obtiveram diferentes quantidades de tubos formados, dependendo do isolado utilizado. A formação de TACs parece ser uma característica frequente de isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* causadores de PA, embora sejam necessários maiores estudos com outros isolados.

Os conídios de isolados que não formaram TACs tiveram alta germinação, diferenciação do apressório e acúmulo de melanina. Esses processos exaurem rapidamente as reservas de energia do conídio (Ferreira *et al.*, 2006) que poderiam ser utilizadas para formação de TACs. Visto que TACs e apressórios de *Colletotrichum* são mais facilmente formados em condições de baixa disponibilidade de nutrientes exógenos (Dean, 1997; Ishikawa *et al.*, 2010, Gonçalves & Stadnik, 2012), ambos os processos são quase que totalmente dependentes da energia armazenada no conídio. Assim, a formação dessas estruturas podem competir em demanda de nutrientes e energia, o que explicaria a elevada correlação negativa entre o percentual de apressórios melanizados e número de TACs.

Os conídios de espécies que não formaram TACs produziram, em geral, apressórios sésseis, típicos de algumas espécies do gênero *Colletotrichum* (Bailey *et al.*, 1992) e frequentemente melanizados, como observado por Gonçalves & Stadnik (2012). A presença da melanina nos apressórios dos fungos é essencial para patogênese (Thines; Weber & Talbot, 2000; Kubo *et al.*, 1991) para fungos tais como *Colletotrichum*

ssp. penetram diretamente pela cutícula (O'Connell *et al.*, 2000; Woloshuk & Sisler, 1982). Assim, a formação de apressório e seu acúmulo de melanina é uma forma de rapidamente obter nutrientes de seu hospedeiro. Diferentemente, os TACs podem tanto aumentar a variabilidade genética da população (Ishikawa *et al.*, 2010b), quanto translocar nutrientes (Read *et al.*, 2009), distribuindo-os pelos diferentes conídios (Roca *et al.*, 2005). Desta forma, num conjunto de conídios em que o percentual de formação de apressórios melanizados é elevado, conseguindo rapidamente infectar e obter os nutrientes diretamente do hospedeiro, a habilidade de formação de TACs para proporcionar a distribuição desses nutrientes seria praticamente desnecessária.

Semelhanças nos processos de formação de apressórios e TACs já foi observada para leveduras por Read & Roca (2006). Primeiramente, a formação de ambas as estruturas requer adesão celular e digestão da parede. Também, a MAP kinase (*mitogen activated protein*) tem um papel fundamental tanto na diferenciação e melanização do apressório (Takano *et al.*, 2000; Thines, Weber & Talbot, 2000) como também na indução de TACs (Liu *et al.*, 2011; Glass, & Fleissner, 1994). Assim, as vias de biossíntese de compostos envolvidos na formação dos TACs e apressórios melanizados podem acabar competindo por metabólitos em comum.

A frequência de formação de cada categoria de TAC depende da espécie e isolado. Em geral, TACs que conectam dois tubos germinativos parecem ser menos comuns do que os que conectam dois conídios (Roca *et al.* 2005; Roca, Read & Wheals, 2005). A emissão de TACs a partir do tubo foi claramente observada para *N. crassa* (Roca *et al.*, 2005), mas para *Colletotrichum* spp. os resultados ainda são escassos (Roca *et al.*, 2003; Ishikawa *et al.*, 2009; Ishikawa *et al.*, 2010). Isso pode ocorrer devido ao fato de que, muitas vezes, a distinção entre tubos germinativos e TACs é muito mais difícil de ser realizada para *Colletotrichum* do que para *N. crassa* (Ishikawa *et al.*, 2009; Ishikawa *et al.*, 2010).

Seja conectando dois tubos germinativos ou um tubo e um conídio, os TACs emitidos a partir de tubos germinativos eram, em geral, menos frequente que os emitidos do conídio. Isso explicaria a correlação significativa entre conexões do tipo t-t e t-c, pois ambas dependem de emissão a partir do tubo germinativo para que ocorram. Isso pode denotar que a regulação do processo de emissão de TAC a partir do tubo germinativo pode ser diferente daqueles emitidos por conídios. Isso foi sugerido por Ishikawa *et al.*, (2010), que afirmaram que não é claro se os

TACs emitidos dos tubos geminativos se diferem das hifas de fusão curtas na colônia madura, formadas por processos diferentes (Read *et al.*, 2009).

O desenvolvimento semelhante dos TACs sobre poliestireno e folhas destacadas indica que o poliestireno é uma superfície eficiente na simulação da cutícula foliar. Superfícies inertes e semi-hidrofílicas ou hidrofílicas, como o celofane e poliestireno, são comumente utilizadas na simulação do tecido do hospedeiro (Xiao *et al.*, 1994; Beleski-Carneiro, Sugui & Reicher, 2002; Fudal *et al.*, 2007), inclusive para *C. gloeosporioides* da macieira (Gonçalves & Stadnik, 2012; Shane & Sutton, 1981).

A formação de TACs sobre superfície foliar também foi relatada por Latunde-Dada *et al.* (1999), Ishikawa *et al.* (2009) e Araújo & Stadnik (2013b). Isso revela que estas estruturas são formadas em condições naturais, podendo ser uma das formas de que espécies de *Colletotrichum* utilizam para gerar variabilidade genética. Assim como em lâminas de poliestireno, a conexão do tipo t-t foi menos frequente e o isolado que emitiu mais TACs com este tipo de conexão, também desenvolveu mais daquelas do tipo t-c. Isso reforça a hipótese de que os processos de emissão do TACs a partir do tubo germinativo e diretamente do conídio podem ser dados por mecanismos distintos, mas que ocorrem concomitantemente.

A realização de estudos do processo de formação de tubos de anastomose em *Colletotrichum* spp. da macieira é uma ferramenta útil para caracterização de isolados, populações, espécies, ou complexos. Também, pode fornecer informações interessantes, tanto quando se observa este processo como um mecanismo para aquisição de variabilidade, quanto de preservação e proteção do material genético pela produção de cópias e trânsito destas para outros conídios mais aptos à sobrevivência. Além disso, a formação de tubos de anastomose pode ser estudada como uma forma de sobrevivência do organismo num ambiente não propício.

A observação de TACs pode fornecer informações sobre como é dada parte da aquisição da variabilidade em uma população de *Colletotrichum* spp, sobretudo, quando realizada sobre a superfície do hospedeiro. Desta forma, é possível obter informações precisas sobre como ocorreria o processo na natureza. Outras técnicas poderiam ser futuramente aplicadas para alcançar maior detalhamento no monitoramento deste evento. Adicionalmente ao uso de corantes, Ishikawa *et al.* (2012) e Ruiz-Roldán *et al.* (2010) utilizaram fungos que tornaram-se quiméricos após sofrerem transformação genética,

adquirindo a capacidade de expressar GFP (*green fluorescent protein*), RFP (*red fluorescent protein*) (Ishikawa *et al.*, 2012) ou ChFP (*cherry fluorescent protein*) (Ruiz-Roldán *et al.*, 2010). Com estas técnicas, é possível observar o desenvolvimento do organismo vivo e monitorar a dinâmica nuclear ao longo do tempo.

Alguns isolados, como o MANE 55 e MANE 70 não formaram TACs sobre lâminas de poliestireno, mas foram amplamente autocompatíveis quando pareados seus mutantes auxotróficos. É possível que isto corrobore com algumas críticas existentes sobre a aplicação destes mutantes para verificação da compatibilidade. Caten & Jinks (1966) afirmam que o uso de mutantes auxotróficos como marcadores genéticos seletivos é um método forçado, em que são suplantadas as barreiras naturais que ocasionariam a autoincompatibilidade. Outra hipótese seria de que a presença de nutrientes venha a favorecer a formação de hifas de fusão na colônia madura que podem acelerar o processo de emissão do tubo germinativo (Gonçalves & Stadnik, 2012; Araújo, Gonçalves & Stadnik, 2014) e torná-lo mais longo (Araújo, Gonçalves & Stadnik, 2014). Assim, a colônia poderia desenvolver-se mais rapidamente e com hifas mais longas, proporcionando uma maior área superficial para formação de hifas de fusão.

Outra razão pelo qual os isolados MANE 55 e MANE 70 foram autocompatíveis em MM, mas em poliestireno não formaram TACs, seria a impossibilidade da formação de apressórios sobre superfícies hidrofílicas, como o ágar. Como tubos germinativos são estimulados à formação de apressórios em superfícies com características hidrofóbicas (Xiao *et al.*, 1994; Kamakura *et al.*, 2002), sobre o meio de cultura esperaria-se a formação de menor número de apressórios melanizados. Assim, na falta de estímulo à formação destes, compostos envolvidos na cascata da MAP kinase que seriam utilizados para desencadear a diferenciação do apressório e seu acúmulo de melanina, podem ser utilizados para formação de tubos de anastomose. Porém mais estudos são necessários para esclarecer estas relações.

Comparações silmutâneas dos dois métodos para averiguação da compatibilidade vegetativa e transferência de componentes genéticos devem ser feitas com cautela. De qualquer modo, ambos podem fornecer informações sobre o processo de geração de variabilidade por meios parassexuais, porém o método utilizado para verificar a formação de TACs parece mais se aproximar de uma condição natural.

De fato, estudos sobre o processo de parassexualidade podem gerar muitas informações interessantes acerca das populações de *Colletotrichum* spp. da macieira. Embora o desencadeamento deste fenômeno pareça comum para algumas espécies do gênero, a frequência é dependente de características inerentes aos isolados. Há evidências que patógenos causadores de PA e MFG possam trocar material genético, porém isso deve ser avaliado em condições naturais, bem como o efeito disto no aumento da agressividade e na ampliação do espectro de hospedeiros. O aparente antagonismo entre os processos de formação de TACs e formação e melanização de apressórios deve ser averiguado, podendo tornar-se um objeto de interesse para pesquisas futuras.

7. REFERÊNCIAS

ABDELRAHMAN, T.; LETSCHER BRU, V.; WALLER, J.; NOACCO, G.; CANDOLFI, E. (2006). Dermatormycosis: comparison of the performance of calcofluor and potassium hydroxide 30% for the direct examination of skin scrapings and nails. **Journal of Mycologie Médicale**, 16, pp.87-91.

ALANIZ, S.; HERNÁNDEZ, L.; DAMASCO, D.; MONDINO, P. (2012). First Report of *Colletotrichum acutatum* and *C. fragariae* causing bitter rot of apple in Uruguay. **Plant Disease**, v. 96, n.3, p.458.

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C.W. **Introductory mycology** (1907). 3th edition, New York: J. Wiley, c1979. xviii, 632p.

ARAÚJO, L.; GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. (2014). Ulvan effect on germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytoparasitica**. doi 10.1007/s 12600-014-0404-07.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M.J. (2013a). Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated with enhanced activity of peroxidases. **Acta Scientiarum**, v.35, n.3, pp.287-293.

ARAÚJO, L. STADNIK, M. J. (2013b). Múltiplos apressórios e tubos de anastomoses conidiais no processo infeccioso de *Colletotrichum gloeosporioides* em macieira. **Bragantia**, v.72, n.2, pp.180-183.

ARAÚJO, L.; STADNIK, M. J. (2011). 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 Pathology**, v.36, pp.241-248.

ARMITT, S.; McCULLOUGH, W.; ROBERTS, C.F. (1993). Analysis of acetate non-utilizing (am) mutants in *Aspergillus nidulans*. **Journal of General Microbiology**. v.92, pp. 263-282.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C.. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: Biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992, pp.88-120.

BAYMAN, P.; COTTY, P.J. (1990). Vegetative compatibility and genetic diversity in *Aspergillus flavus* population of a single field. **Canadian Journal of Botany**, v. 69, pp. 1707-1711.

BEEVER, R.E.; OLSEN, T.L.; PARKES, S.L. (1995). Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) from apple and other fruits. **Australasian Plant Pathology**, v.24, n.2; pp.126-132.

BEN-DANIEL, B.; BAR-ZVI, D.; JOHNSON, D.; HARDING, R.; HAZANOVISKY, M.; TSHOR, L. (2010). Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes* subpopulations from Australia and genetic links with subpopulations from Europe/Israel and North America. **Phytopathology**, v. 100, n.3, pp.271-278.

BENDER, R. J. 1986. Botânica e fisiologia. In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, SC: EMPASC, 1986. 562p

BELESKI-CARNEIRO, E.; SUGUI, J.A.; REICHER, F. (2002). Structural and biological features of a hydrogel from seed coats of *Chorisia speciosa*. **Phytochemistry**, v.61, n.2, pp.157-163.

BITTENCOURT, C.C; MATTEI, L. F.; SANT'ANNA, P.R., LONGO, O. C.; BARONE, F.M. (2011). A cadeia produtiva da maçã em Santa Catarina: competitividade segundo produção e *packing house*. **Revista de Administração Pública**, v.45, n.2, pp.1199-1222.

BLEICHER, J. História da macieira. In: **A Cultura da macieira**. Florianópolis: EPAGRI, 2002. p.29-36.

BONETI, J.I.S.; KATSURAYAMA, Y. Doenças da macieira (*Malus domestica* Bork.). In: BONETI, J.I.S.; RIBEIRO, L.G.,

KATSURAYAMA, Y. (Eds.). **Manual de identificação de doenças e pragas da macieira**. Florianópolis, EPAGRI, 1999, pp.13-95.

BRENT, K.J.; HOLLOMON D.W, (1998). **Fungicide Resistance: the Assessment of Risk**. FRAC Monograph no. 2. Brussels, Belgium: Global Crop Protection Federation

BROOKER, N. L.; LESLIE, J. F.; DICKMAN, M. B. (1991). Nitrate Non utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, v, 81, n. 6, pp. 672-677.

CANTORAL, J.M.; GUTIÉRRES, S.; FIERRO, F; GIL-ESPINOSA, S.; LIEMPT, H. MARTÍN, J. F. (1993). Biochemical characterization and molecular genetics of nine mutants of *Penicillium chrysogenum* impaired in penicillin biosynthesis. **The Journal of biological chemistry**, v.268, n. 1, pp. 737-744.

CARLILE, M. J.; WATKINSON, S. C.; GOODAY, G. W. **The Fungi**. 2nd. ed. Amsterdam: ELSEVIER, 2001. xix,588p

CASTRO-PRADO, M.A.A; QUEROL, C.B.; SANT'ANNA, J.R., MYAMOTO, C.T.; FRANCO, C.C.S.; MANGOLIN, C.A.; MACHADO, M.F.P.S (2007). Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n.3, pp.634-642.

CATEN, C. E.; JINKS, J. L. (1966). Heterokaryosis: its significance in wild homothallic ascomycetes and fungi imperfecti. **Transactions of the British Mycological Science**, v. 49, pp.129-138.

CHEN, R.; McDONALD, B. A. (1996). Sexual reproduction plays major role in the genetic structure of populations of fungus *Mycosphaerella graminicola*. **Genetics**, n. 142, pp. 1119-1127.

CORRELL, J. C.; KLITTICH, C. J. R.; LESLIE, J. F. (1987). Nitrate non utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in Vegetative compatibility tests. **Phytopathology**, v.77, n.12, pp. 1640-1646.

BUXTON, E.W. (1956). Heterokaryosis and Parasexual Recombination in Pathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. **Journal of General Microbiology**, v.15, pp.133-139.

CORRELL, J. C.; PUHALLA, J. E.; SCHNEIDER, R. W.(1986a). Identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *apii* on the basis of colony size, virulence and vegetative compatibility. **Phytopathology**, v. 76, n.4, pp.396-400.

CORRELL, J. C; PUHALLA, J. E.; SCHNEIDER, R. W.(1986b). Vegetative compatibility groups among nonpathogenic root-colonizing strains of *Fusarium oxysporum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 64, n. 10, pp. 2368-2361.

CLINTON, G.P (1902). **Apple rots in Illinois**. Urbana: Agricultural Experiment Station, University of Illinois. pp.193-224. (Bulletin, 69)

CRUSIUS, L. U.; FORCELINI, C. A.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M.; FERNANDES, J. M. C. Epidemiology of apple leaf spot. **Fitopatologia Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 65-70, 2002

DEAN, R. A (1997). Signal pathways and appressorium morphogenesis. **Annual Review of Phytopathology**, v.35, p.211-34.

DAMM, U.; CANNON, P. F.; WOUDEBERG, J. H. C; CROUS, P. W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. **Studies in Mycology**, v. 73, pp. 37-113.

DEBETS, J. M. A. (1998). Parasexuality in Fungi: Mechanisms and significance in wild populations. In: BRIDGE, P. D.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. M. **Molecular variability of fungal pathogens**. Wallingford: CAB International, 1998. xiv, 319p.

DIEA (Dirección de Estadísticas Agropecuarias). 2014. Encuesta frutícola de hoja caduca: Zafra 2013. MGAP, Uruguay. 28p.

DESJARDINS, A. E. (1995). Population structure of *Gibberella pulicaris* (Anamorph *Fusarium sambucinum*) from potato tuber dry rot in North America and Europe. **American Potato Journal**, v.72, pp.145-156.

EATON, C. J.; CABRERA, I. E.; SERVIN, J. A.; WRIGHT, S. J.; COX, M. P.; BORKOVICH, K. A. (2012). The Guanine nucleotide exchange factor RIC8 regulates conidial germination through Gα proteins in *Neurospora crassa*. **PLoS One**, v.7, n. 10.

FERREIRA, E.M. *et al.* Eficiência de fungicidas sistêmicos para o controle de *Cylindrocladium candelabrum* em eucalipto. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, n. 5, pp.468-475.

FISCHER-HARMAN, V.; JACKSON, K. J.; MUNÓZ, A.; SHOJI, J.; READ, N. D. (2012). Evidence for tryptophan being a signal molecule that inhibits conidial anastomosis tube fusion during colony initiation in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v.49, pp.896-902.

FREEMAN, S.; KATAN, T. (1997). Identification of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose and root necrosis of strawberry in Israel. **Phytopathology**, v.87, n.5, pp.516-521.

FREEMAN, S.; SHABI, E.; KATAN, T. (2000). Characterization of *Colletotrichum acutatum* causing anthracnose of anemone (*Anemone coronária* L.). **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, n.12, pp.5267-5272.

FLEISSNER, A.; LEEDER, A. C.; ROCA, M. G.; READ, N. D.; GLASS, N. L. (2009). Oscillatory recruitment of signaling proteins to cell tips promotes coordinated behavior during cell fusion. **Proceedings in National Academy of Science of United States of America**, v.106, n. 46, pp.19387-19392.

FLEISSNER, A.; SARKAR, S. JACOBSON, D.J.; ROCA, M. G.; READ, N. D.; GLASS, N. L. (2005). The so locus is required for vegetative cell fusion and postfertilization events in *Neurospora crassa*, **Eukaryotic Cell**, v.4, n.5, pp. 920-930.

FU, C.; IYER, P.; HERKAL, A.; ABDULLAH, J.; STOUT, A.; FREE, S. J. (2011). Identification and characterization of genes required for cell-cell fusion in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n.8, pp. 1100-1109.

FUDAL, I.; COLLEMARE, J.; B'HNERT, H.U.; MELAYAH, D.; LEBRUN, M. (2007). Expression of *Magnaporthe grisea* Avirulence Gene ACE1 is connected to the Initiation of appressorium-mediated penetration. **Eukaryotic Cell**, n. 6, pp.546-554.

FIORAVANÇO, J.C; LAZZAROTTO, J.J (2012). A culra de macieira no Brasil reflexões sobre produção, mercado e fatores determinantes da competitividade futura. **Informações Econômicas**, v.42, n. 4, pp .42-54.

GARRET, R. H.; AMY, N. K. (1978). Nitrate assimilation in fungi. **Advances in Microbial Phisiology**, v. 18, pp. 1-65.

GLASS, N. L.; RASMUSSEN, C.; ROCA, M. G.; READ, N. D. Hyphal homing, fusion and mycelial interconecdness. **Trends in microbiology**, v. 12, n. 3pp.135-141.

GONÇALVES, A. E.; STADNIK, M. J. (2012). Interferência de ulvana na formação melanização de apressórios de *Colletotrichum gloeosporioides*. **Tropical Plant Pathology**, v.37, n.6, pp.431-437.

GONZÁLES, Eugenia. Characterization of isolates of *Glomerella cingulata* causal agent of Glomerella leaf spot and bitter rot of apples based on morphology and genetic, molecular, and pathogenicity tests. Raleigh, NC, 2003, 121p. Thesis (Phd). North Caroline State University, 2003.

GONZÁLES, E.; SUTTON, T.B. (1999). First report of Glomerella Leaf Spot (*Glomerella cingulata*) of apple in United States. **Plant Disease**, 83, p. 1074.

GONZÁLES, E.; SUTTON, T.B. (2004). Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing Glomerella Leaf Spot and Bitter Rot of Apples in three orchards in North Carolina. **Plant Disease**, v.88, n. 2, pp.1335-1340.

GONZÁLES, E.; SUTTON, T. B.; CORRELL, J. C. (2006). 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. **Phytopathology**. v. 19, n. 9, pp.982-992.

HADIZADEH, I.; BANIHASHEMI, Z. (2007). Vegetative compatibility grouping of *Verticillium dahliae* from pistachio in Iran. **Phytopathologia Mediterrânea**, v. 46, pp.272-284.

HAMADA, Natasha Akemi. **Caracterização morfológica, patogênica e molecular de isolados de *Colletotrichum* spp. em macieira**. Florianópolis, SC, 2005. xii, 106 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais.

HARRIS; S. A.; ROBINSON, J. P.; JUNIPER, B. E. (2002). Genetic clues to the origin of apple. **Trends in Genetics**, v. 18, n. 1, pp. 426-430.

HAWTHORNE, B. T.; REES-GEORGE, J. (1996). Use of nitrate non-utilizing mutants to study vegetative incompatibility in *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), especially members of mating populations I, V and VI. **Mycology Research**, v.100, n.9, pp.1075-1081.

HUANG, C.; ROBERTS, P. D.; GALE, R. L.; ELMER, W. H.; DATNOFF, L. E. (2013). Population structure of *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Florida inferred from vegetative compatibility groups and microsatellites. **European Journal of Plant Pathology**, v.136, n.3, pp. 509-521.

HYDE, K. D.; KAI, L.; McKENZIE, E.H.C.; YANG, Y. L.; ZHANG, J. Z.; PRIHASTUTI, H. (2009). *Colletotrichum*: A catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, v. 39, pp.1-17.

ISHIKAWA, F. H.; BARCELOS, Q. L.; ALVES, E.; JÚNIO, O. A. C.; SOUZA E. A (2009). Symptoms and Prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, v. 159, pp. 270-277.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; READ, N. D.; ROCA, M. G. (2010). Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, v. 114, pp. 2-9.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; SHOJI, J.; CONNOLLY, L.; FREITAG, M.; READ, N. D.; ROCA, M. G. (2012). Heterokarion incompatibility is suppressed following conidial anastomosis tube fusion in a fungal plant pathogen. **Plos One**, n. 7, v. 2.

JACOBSON, D. J.; GORDON, T. R. (1988). Vegetative compatibility and self-incompatibility within *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. **Phytopathology**, v. 78, n. 6, pp. 668-672.

JAMES, S. W.; MIRABITO, P. M.; SCACHERI, P. C.; MORRIS, N. R. (1995). The *Aspergillus nidulans bimE* (blocked-in-mitosis) gene encodes multiple cell cycle functions involved in mitotic checkpoint control and mitosis. **Journal of Cell Science**, n. 108, pp.3485-3499.

JIMÉNEZ- GASCO, M. M.; NAVAS-CORTÉS, J. A.; JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. (2004). The *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris/Cicer arietinum* pathosystem: a case study of the evolution of plant-pathogenic fungi into races and pathotypes. **International Microbiology**, v 7, pp.95-104.

JUNIPER, B.E.; WATKINS, R.; HARRIS, S.A (1999). The origin of the apple. **Acta Horticulturae**, v.484, pp.27-33.

KAMAKURA, T.; YAMAGUCHI, S.; SAITOH, K.; TERAOKA, T.; YAMAGUCHI, Y. (2002). A novel gene, *CBP1*, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. **Molecular Plant-Microbes Interaction**, v.15, pp.437-444.

KATAN, T.; KATAN, J. (1988). Vegetative compatibility grouping of *Fusarium oxysporum* f. sp. from tissue and rhizosphere of cotton plants. **Phytopathology**. v.78, n.6, pp.852-855.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. (2009). Manejo das doenças de verão da macieira no Sul do Brasil. In: STADNIK, M.J. (Ed.). **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, p.105-126.

KINSEY, J.A. (1990). Tad, a LINE-like transposable element of *Neurospora*, can transpose between nuclei in heterokaryons. **Genetics**, v. 126, n.31, pp.317-323.

KLITTICH, C. J. R. ; CORRELL, J. C. ; LESLIE, J. F. (1988). Inheritance of sectoring frequency in *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikoroi*). **Experimental micology**, v. 12, pp. 289-294.

KOROLEV; N.; KATAN, J; KATAN, T. (2000). Vegetative compatibility groups of *Verticillium dahliae* in Israel: their distribution and association with pathogenicity. **Phytopathology**, v. 90, n.5; pp.529-536.

KREUZ, C.L.; SOUZA, A.; PETRI, J.L. (2006). Impacto da intensificação da densidade de plantio na rentabilidade em duas cultivares de macieira em Fraiburgo-SC. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, n. 2, pp. 240-243.

KUBO, Y.; NAKAMURA, H.; KABAYASHI K.; OKUNO, T.; FURUSAWA, I. (1991). Cloning of melanin biosynthetic gene essential for appressorial penetration of *Colletotrichum lagenarium*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 4, n. 5, pp.440-445.

LARDNER, R.; JOHNSTON, P.R.; PLUMMER, K.M.; PEARSON, M.N. (1999). Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. **Mycology Research**, v.103, n.3, pp.275-285.

LATUNDE-DADA, A. O; O'CONNELL, R. J.; NASH, C.; LUCAS, J. A. (1999). Stomatal penetration of cowpea (*Vigna unguiculata*)leaves by a *Colletotrichum* species causing latent anthracnose. **Plant Pathology**, 48, pp.777-785.

LESLIE, J. F.(1993). Fungal Vegetative Compatibility. **Annual Review Phytopathology**, v.31, pp-137-150.

LESLIE, J.F. (1996). Fungal Vegetative Compatibility- Promises and Prospects. **Phytoparasitica**, v.24, n.1, pp. 1-4.

LIU, T.; LIN, M.; KO, W. (2011). Development of artificial conidia for ecological studies of *Rhizoctonia solani* in soil. **New Biotechnology**, v. 11, n. 1; pp.86-91.

LIU, W.; SOULIÉ, M.; PERRINO, C.; FILLINGER, S. (2011). The osmosensing signal transduction pathway from *Botrytis cinerea* regulates cell wall integrity and MAP kinase pathways control melanin biosynthesis with influence of light. **Fungal Genetics and Biology**, v. 48, pp.377-388.

LOCKWOOD, L.B.; RAPER, K.B.; MOYER, A. J.; COGHILL, R. D. (1945). The production and characterization of ultraviolet-induced mutations in *Aspergillus terreus*. III. Biochemical characteristics of mutations. **American Journal of Botany**, v.32, n.4, pp.214-217.

LYNCH, M.; BLANCHARD, J. L. (1988). Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. **Genetica**, v. 102/103, pp. 29-39.

MILGROON, M.G. (1996). Recombination and the multilocus structure of fungal populations. **Annual Review of Phytopathology**, v. 34, pp. 457-477.

McDONALD, A.M. (1997). The Population Genetics of Fungi: Tools and Techniques. **Phytopathology**, v. 87, n. 4, pp.448-453.

NITZAN, N.; HAZANOVSKY, M.; TAL, M.; TSROR, L.(2002). Vegetative compatibility groups in *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of black dot on potato. **Phytopathology**, v. 92, n. 8, pp.827-832.

NITZAN, N.; TSROR, L. JOHNSON, D. A. (2006). Vegetative compatibility groups and aggressiveness of North American isolates of *Colletotrichum coccodes*, the causal agent of Potato Black Dot. **Phytopathology**, v. 90, n.10, pp. 1287-1292

O'CONNELL, R.; PERFECT, S.; HUGHES, B.; CARZANIGA, R.; BAILEY, J.; GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection process. In: PRUSKY,D.; FREEMAN,S.; DICKMAN,M.B. *Colletotrichum: Host specificity, pathology and host-pathogen interaction*. St.Paul-Minnesota, APS Press. 2000. pp. 57-77.

POGÁNY, M.; RAD, U.; GRÜN, S.; DONGÓ, A.; PINTYE, A.; SIMONEAU, P.; BAHNWEIG, G.; KISS, L.; BARNA, B.; DURNER, J. (2009). Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an *Arabidopsis-Alternaria* pathosystem. **Plant Physiology**, v. 151, pp. 1460-1475.

PANDEY, A.; ROCA, M. G.; READ, N. D.; GLASS, N. L. Role of Mitogen-activated kinase pathway during conidial germination and hyphal fusion in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v.3. n. 2, pp. 348-358.

PONTECORVO, G. (1956). The parasexual cycle in fungi. **Annual Review of Microbiology**, v.10, pp. 393-400.

PUHALLA, J. E. (1985). Classification of the strains of *Fusarium oxysporum* on the basis of vegetative compatibility. **Canadian Journal of Botany**, n. 3, pp. 179-183.

READ, N. D.; GORYACHEV, A. B.; LICHIOUS; A. (2012). The mechanistic basis of self-fusion between conidial anastomosis tubes during fungal colony initiation. **Fungal Biology Reviews**, v. 26, pp.1-11.

READ, N.D; LICHIOUS, A.; SHOJI, J.; GORYACHEV, A.B. (2009). Self-signaling and self-fusion in filamentous fungi. **Current opinion in microbiology**, v.12, n.6, pp.608-615.

READ, N. D.; ROCA, M. G. Vegetative hyphal fusion in filamentous fungi. In: **Cell Cell Channels**. BALUSKA, F.; VOLKMANN, D.; BARLOW, P. W. Landes Bioscience – Springer Verlag. Berlin–Heidelberg–New York. 2006. pp. 87-98.

RIBEIRO, P.A. (1986). Descrição e comportamento de algumas cultivares de macieira no sul do Brasil. In: EMPRESA CATARINENSE DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual da cultura da macieira**. Florianópolis, SC: EMPASC, 1986. 562p.

ROBINSON, M.; SHARON, A. (1999). Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschnomene* by

electroporation of germinated conidia. **Current Genetics**, v. 36, pp. 98-104.

ROCA, M.G.; ARTL, J.; JEFFREE, C. E; READ, N. D. (2005). Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, v. 4, n. 5, pp.911-919.

ROCA, M. G.; READ, N. D.; WHEALS, A. E (2005). Conidial anastomosis in filamentous fungi. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, pp.191-198.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; DAVIDE, L. M. C.; MENDES-COSTA, M. C.; SCHWAN, R. F.; WHEALS, A. E. (2004). Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum* species. **Mycology Research**, v. 108, pp. 1320-1326.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA; M. C.; WHEALS, A. (2003). Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 40, pp. 138-145.

RUIZ-ROLDÁN, M. C.; KÖHLI, M.; RONCERO, M.I; PHILLIPSEN, P.; DI PIETRO, A.; ESPESO, E. A. Nuclear Dynamics, during germination, conidiation and hyphal fusion of *Fusarium oxysporum*. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 8, pp.1216-1224.

SHANE, W. W.; SUTTON, T. B. (1981). Germination, appressorium formation, and infection of immature and mature apple fruit by *Glomerella cingulate*. **Phytopathology**, v. 71, pp. 454-457.

SHARIF, K.; ZARE, R.; REES-GEORG, J. (2008).Vegetative compatibility among *Fusarium solani* isolates causing Potato Dry Rot. **Journal of Biological Science**, v.8, n.2, pp.374-379.

SHI, Y.; CORRELL, J. C.; GUERBER, J. C.; ROM, C. R. (1996). Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in Southeastern United States. **Plant Disease**, v. 80, n 6, pp. 692-696.

SHISLER, D.A.; JACKSON, M. A.; BOTHAST, R. J. (1991). Influence of nutrition during conidiation of *Colletotrichum truncatum* on conidial

germination and efficacy in inciting disease in *Sesbania exaltata*. **Phytopathology**, v.81, pp. 458-461.

SILVA, A.R., TOGNON, C. H., BRANDÃO, M. A. L.; JAFELICE, R. S. M. (2007). O Uso de Modelagem matemática no cálculo do volume de uma maçã. **FEMAT em Revista**, n. 9, pp. 365-384.

STADNIK, M.J. & BUCHENAUER, H. (2000). Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 57, pp.25-34.

STADNIK M.J.; ARAÚJO, L., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. (2009). Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de *Glomerella* e da sarna da macieira In: STADNIK, M.J. (Ed.). **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, p.105-126.

SWANSON, CP; HOLLAENDER, AS; KAUFMANN, B (1948). Modification of the X-ray and ultraviolet induced mutation rate in *Aspergillus terreus* by pretreatment with near infrared radiation. **Genetics**, v. 1 33, n. 4, pp.429-437.

TALAMINI, V.; BOGO, A.(2009). Epidemiologia e sistemas de previsão de doenças da macieira. In: STADNIK, M.J. (Ed.). **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis, CCA-UFSC, p.105-126.

TAKANO, Y.; KIKUCHI, T.; KUBO, Y.; HAMER, J. E.; MISE, K.; FURUSAWA, Y. (2000). The *Colletotrichum lagenarium* MAP Kinase Gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 4, pp. 374-383.

TAYLOR, J. (1971). Necrotic leaf blotch and fruit rot caused by a strain of *Glomerella cingulata*. **Phytopathology**, v. 61, pp.221-224.

TAYLOR, J.W., JACOBSON, D.J., FISHER, M.C., 1999. The evolution of asexual fungi: reproduction, speciation and classification. **Annual Review of Phytopathology**, v.37, pp.197-246.

TINLINE, R. D; McNEILL, B. H. (1969). Parasexuality in plant pathogenic fungi. **Annual Reviews of Microbiology**. v. 7, pp. 147-168

THINES, E.; WEBER, R.W.S.; TALBOT, N (2000). MAP Kinase and protein kinase a-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. **The Plant Cell**, v. 12, pp.1703–1718.

TYPAS, M. A. (1983). Heterokaryon incompatibility and interespecific hibridization between *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae* following protoplast fusion and microinjection. **Journal of General Microbiology**, 129, pp.3043-3056.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M; BECKER, W.; BONETI, J. I.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A. B. C. (2002). EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPEQUÁRIA. **Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã**. Disponível em :<<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir036.pdf>>. Acesso em 5 de janeiro de 2014.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. (2003). EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPEQUÁRIA. **Produção integrada de maçãs no Brasil**. Disponível em :<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Maca/ProducaoIntegradaMaca/index.htm>>. Acesso em 20 de dezembro de 2013

VARZEA, V.M.P.; RODRIGUES, C.J.; LEWIS, B.G. (2002). Distinguishing characteristics and vegetative compatibility of *Colletotrichum kahawe* in comparison with other related species from coffee. **Plant Pathology**. V. 51, 202-207.

VELHO, A. C.; STADNIK, M.J.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; ALANIZ, S. (2014a). First Report of *Colletotrichum nymphaeae* Causing Apple Bitter Rot in Southern Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.4, p.567.

VELHO, A. C.; STADNIK, M.J.; CASANOVA, L.; MONDINO, P.; ALANIZ, S. (2014b). First Report of *Colletotrichum karstii* Causing *Glomerella* Leaf Spot on Apple in Santa Catarina State, Brazil. **Plant Disease**, v.98, n.1, p. 157.

VIVIAN, S.; HÉCTOR, A.; MERCEDES, A.; MATIAS, M. ALFEDO, G. (2011). Modelos de cuantificación de frío efectivo invernal adaptados a la producción de manzana en Uruguay. **Agrociencia Uruguay**, v. 15, n. 2, pp. 19-28.

WANG, C. X.; ZHANG, Z. F.; LI, B. H.; WANG, H. Y.; DONG, X. L. (2012). First report of Glomerella Leaf Spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. **Plant Disease**, v. 96, n. 6, p. 912.

WHARTON, P. S.; DIÉGUEZ- URIBEONDO (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. **Anales del Jardín Botánico de Madrid**, n.61, v. 1, pp.3-22.

WOLOSHUK, C. P.; SISLER, H. D. (1982). Tricyclazole, Pyroquilon, Tetrachlorophthalide, PCBA, Coumarin and related compounds inhibit melanization and epidermal penetration by *Pyricularia oryzae*. **Journal of Pesticide Science**. v. 7, pp.161-166.

XIAO, J. Z.; WATANABE, T.; OHSHIMA, A.; YAMAGUCHI, I. (1994). Studies on cellular differentiation of *Magnaporthe grisea*. Physicochemical aspects of substratum surfaces in relation to appressorium formation. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 44, pp.227-236.

YAGO, J. I.; LIN, C.; CHUNG, K. (2011). The SLT2 mitogen-activated protein kinase-mediated signalling pathway governs conidiation, morphogenesis, fungal virulence and production of toxin and melanin in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. **Molecular Plant Pathology**, v.12, n. 7, pp. 653-665,

8. ANEXOS

Anexo 1- Percentual de germinação conidial de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	39,6	51,4	51,7	52,3	64,2	76,5
MANE 55	63,3	67,2	67,2	71,8	71,8	79,5
MANE 70	65,8	69,2	73,1	73,0	72,9	83,1
MANE 143	9,9	10,3	13,4	13,3	17,1	20,3
MANE 144	31,7	49,2	57,9	58,4	61,4	61,6
MANE 147	82,5	84,9	84,0	83,6	85,2	83,8
C15	4,6	6,8	11,0	11,1	11,3	16,6
C18	1,0	2,3	3,5	7,0	7,1	7,8
C21	13,9	16,2	16,5	20,1	23,3	28,9
C29	8,4	15,5	17,7	21,9	29,8	31,9
C38	13,5	18,8	19,1	18,7	19,5	21,1

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	55,3	59,4	60,0	71,8	78,3	81,8
MANE 55	64,0	65,9	64,3	64,3	67,9	68,4
MANE 70	55,8	60,5	76,3	81,8	84,2	91,4
MANE 143	18,8	22,3	22,8	24,2	24,3	26,2
MANE 144	27,1	47,6	52,9	56,6	56,7	58,4
MANE 147	94,5	95,8	95,6	95,3	95,8	98,8
C15	4,8	5,7	10,7	11,8	12,0	16,7
C18	2,0	2,1	3,2	5,7	9,0	9,9
C21	10,9	12,5	12,7	17,6	20,5	25,6
C29	14,3	21,0	22,2	25,0	29,9	30,2
C38	10,7	18,6	19,2	23,3	25,3	26,0

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	47,4	55,4	55,9	62,0	71,2	79,1
MANE 55	63,7	66,5	65,8	68,0	69,8	73,9
MANE 70	60,8	64,9	74,7	77,4	78,6	87,2
MANE 143	14,4	16,3	18,1	18,7	20,7	23,3
MANE 144	29,4	48,4	55,4	57,5	59,1	60,0
MANE 147	88,5	90,4	89,8	89,4	90,5	91,3
C15	4,7	6,3	10,9	11,5	11,6	16,6
C18	1,5	2,2	3,4	6,4	8,1	8,8
C21	12,4	14,4	14,6	18,9	21,9	27,2
C29	11,3	18,3	20,0	23,4	29,9	31,0
C38	12,1	18,7	19,2	21,0	22,4	23,5

Anexo 2- Percentual de formação de apressórios por conídios de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	35,2	46,4	46,5	46,9	59,1	71,2
MANE 55	56,2	59,6	59,2	64,8	65,0	71,9
MANE 70	62,9	66,7	70,6	70,7	70,3	80,7
MANE 143	6,2	6,3	7,0	6,4	7,4	8,8
MANE 144	20,5	37,3	46,8	47,1	48,2	48,2
MANE 147	80,8	83,3	82,2	81,3	83,0	81,3
C15	3,7	6,1	10,6	10,7	10,4	13,0
C18	0,0	0,0	0,6	1,1	1,0	1,3
C21	13,2	15,2	15,1	17,6	20,3	25,9
C29	4,6	9,3	9,1	10,9	11,0	15,0
C38	8,0	10,7	11,1	10,6	10,5	10,4

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	44,4	48,0	48,8	60,1	64,2	68,2
MANE 55	57,2	57,8	57,4	57,0	61,1	61,4
MANE 70	52,4	57,3	73,1	78,2	80,3	87,3
MANE 143	11,5	13,9	14,2	13,3	12,8	14,8
MANE 144	19,8	39,2	44,2	45,7	45,2	47,0
MANE 147	92,8	94,4	93,4	93,6	94,0	96,6
C15	4,0	5,2	10,3	11,1	11,5	14,2
C18	0,0	0,0	0,4	0,2	1,1	1,0
C21	10,5	12,3	12,2	17,0	19,8	24,9
C29	7,2	11,0	11,8	11,5	14,1	15,2
C38	6,5	10,2	10,0	10,2	10,9	11,6

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	39,8	47,2	47,7	53,5	61,6	69,7
MANE 55	56,7	58,7	58,3	60,9	63,0	66,6
MANE 70	57,7	62,0	71,8	74,5	75,3	84,0
MANE 143	8,8	10,1	10,6	9,8	10,1	11,8
MANE 144	20,1	38,3	45,5	46,4	46,7	47,6
MANE 147	86,8	88,9	87,8	87,4	88,5	89,0
C15	3,9	5,7	10,5	10,9	10,9	13,6
C18	0,0	0,0	0,5	0,6	1,0	1,1
C21	11,9	13,7	13,7	17,3	20,0	25,4
C29	5,9	10,1	10,4	11,2	12,5	15,1
C38	7,3	10,4	10,6	10,4	10,7	11,0

Anexo 3- Percentual de formação de apressórios melanizados por confídios de isolados de *Colletotrichum* spp. da macieira que formaram apressório, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	57,3	60,9	63,8	73,6	86,3	82,2
MANE 55	71,6	88,6	89,8	87,5	86,8	95,7
MANE 70	89,6	89,2	87,7	90,9	96,3	91,9
MANE 143	7,3	7,3	10,5	9,2	11,4	9,7
MANE 144	14,9	31,7	25,4	24,2	23,7	23,4
MANE 147	99,0	97,7	100,0	100,0	100,0	99,6
C15	100,0	100,0	100,0	100,0	96,4	97,9
C18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C21	97,4	96,8	97,7	98,7	96,6	93,7
C29	26,9	20,3	22,4	17,7	37,4	36,9
C38	14,8	10,5	37,3	52,4	53,1	55,0

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	84,0	85,5	95,6	83,0	94,8	90,6
MANE 55	86,1	86,0	86,9	92,5	87,6	86,7
MANE 70	90,6	85,9	86,6	90,4	91,5	85,4
MANE 143	8,0	8,6	10,1	10,4	10,7	10,1
MANE 144	35,6	24,2	24,3	20,0	23,7	22,5
MANE 147	94,0	96,0	97,0	96,3	98,1	97,9
C15	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	98,0
C18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C21	95,9	97,9	98,2	98,6	97,3	100,0
C29	16,3	16,9	13,2	18,4	33,4	28,1
C38	0,0	15,3	24,2	20,6	32,6	31,3

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	70,6	73,2	79,7	78,3	90,5	86,4
MANE 55	78,8	87,3	88,3	90,0	87,2	91,2
MANE 70	90,1	87,6	87,2	90,6	93,9	88,7
MANE 143	7,6	8,0	10,3	9,8	11,0	9,9
MANE 144	25,3	27,9	24,9	22,1	23,7	22,9
MANE 147	96,5	96,8	98,5	98,2	99,0	98,8
C15	100,0	100,0	100,0	100,0	98,2	98,0
C18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C21	96,6	97,3	98,0	98,7	96,9	96,8
C29	21,6	18,6	17,8	18,1	35,4	32,5
C38	7,4	12,9	30,7	36,5	42,8	43,2

Anexo 4- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-t formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	0,0	4,0	4,0	5,3a*
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	5,3a
MANE 144	1,3	2,7	4,0	4,0	6,7	8,0a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	0,0	5,3	2,7	5,3	6,7	13,3a
C38	0,0	0,0	0,0	4,0	8,0	9,3a

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	2,7	4,0	4,0	8,0a
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7a
MANE 144	0,0	1,3	2,7	2,7	4,0	5,3a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0b
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	0,0	1,3	5,3	10,7	10,7	12,0a
C38	0,0	0,0	2,7	5,3	6,7	9,3a

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	1,3	4,0	4,0	6,7b
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,0b
MANE 144	0,7	2,0	3,3	3,3	5,3	6,7b
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0c
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	0,0	3,3	4,0	8,0	8,7	12,7a
C38	0,0	0,0	1,3	4,7	7,3	9,3a

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$).

Anexo 5- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo c-c formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	0,0	0,0	9,3	12,0d*
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	14,7	29,3	34,7	66,7	86,7	125,3a
MANE 144	13,3	44,0	53,3	90,7	88,0	88,0b
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	14,7	26,7	33,3	52,0	66,7	70,7b
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	9,3	8,0	17,3	24,0	38,7	46,7c
C38	0,0	0,0	1,3	8,0	16,0	20,0d

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	2,7	10,7	10,7	13,3c
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	16,0	34,7	37,3	73,3	105,3	137,3a
MANE 144	28,0	53,3	77,3	90,7	92,0	125,3a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	26,6	28,0	44,0	64,0	92,0	94,6b
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	2,7	8,0	14,7	21,3	21,3	26,7c
C38	0,0	0,0	5,3	10,7	28,0	33,3c

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	1,3	5,3	10,0	12,6e
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	15,3	32,0	36,0	70,0	96,0	131,3a
MANE 144	20,7	48,7	65,3	90,7	90,0	106,7b
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	20,7	27,3	38,7	58,0	79,3	82,7c
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	6,0	8,0	16,0	22,7	30,0	36,7d
C38	0,0	0,0	3,3	9,3	22,0	26,7d

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$)

Anexo 6- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	2,7	2,7	5,3	12,0c
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	2,7	2,7	2,7	6,7	8,0	17,3b
MANE 144	10,7	20,0	20,0	36,0	37,3	38,7a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	0,0	0,0	2,7	5,3	12,0	13,3c
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	6,7	9,3	12,0	17,3	21,3	40,0a
C38	0,0	0,0	1,3	4,0	14,7	18,7c

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	4,0	10,7	12,0	14,7c
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	2,7	2,7	2,7	9,3	13,3	28,0b
MANE 144	12,0	20,0	25,3	29,3	32,0	45,3a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	0,0	0,0	2,7	4,0	10,7	10,7c
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	6,7	12,0	18,7	20,0	29,3	41,3a
C38	0,0	0,0	4,0	10,7	29,3	30,7b

Média Experimento 1 x Experimento 2

Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	3,3	6,7	8,7	13,3c
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	2,7	2,7	2,7	8,0	10,7	22,6b
MANE 144	11,3	20,0	22,7	32,7	34,7	42,0a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	0,0	0,0	2,7	4,7	11,3	12,0c
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	6,7	10,7	15,3	18,7	25,3	40,7a
C38	0,0	0,0	2,7	7,3	22,0	24,7b

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$)

Anexo 7- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial totais formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, ao longo de 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	2,6	6,6	18,6	29,3e
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	17,3	32,0	37,3	73,3	94,7	148,0a
MANE 144	25,3	66,7	77,3	130,7	132,0	134,7a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	14,7	26,7	36,0	57,3	78,7	84,0c
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	16,0	22,7	32,0	46,7	66,7	100,0b
C38	0,0	0,0	2,7	16,0	38,7	48,0d

Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	9,3	25,3	26,7	36,0d
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MANE 143	18,7	37,3	40,0	82,7	118,7	172,0a
MANE 144	40,0	74,7	105,3	122,7	128,0	176,0a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C18	26,7	28,0	46,7	68,0	102,7	105,3b
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C29	9,3	21,3	38,7	52,0	61,3	80,0c
C38	0,0	0,0	12,0	26,7	64,0	73,3c

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Isolado	Tempo de incubação (h)					
	14	16	18	20	22	24
MANE 40	0,0	0,0	5,9	15,9	21,9	32,6 d
MANE 55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
MANE 70	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
MANE 143	18,0	34,7	38,7	78,0	106,7	160,3 a
MANE 144	32,7	70,7	91,3	126,7	130,0	155,4 a
MANE 147	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
C15	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
C18	20,7	27,3	41,3	62,7	90,7	94,6b
C21	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0
C29	12,7	22,0	35,3	49,3	64,0	90,1 b
C38	0,0	0,0	7,3	21,3	51,3	60,7 c

*Médias seguidas por mesma letra minúscula na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ($p \geq 0,05$)

Anexo 8- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-t, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	303,111	60,622	4,262	3,1058	5,064
Resíduo	12	170,667	14,222			
Total	17	473,77				
CV(%)*	54,74					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	249,777	49,955	6,2444	3,105	5,06432
Resíduo	12	96	8			
Total	17	345,777				
CV(%)	41,06					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	263,111	52,622	8,457	3,105	5,064
Resíduo	12	74,666	6,222222			
Total	17	337,777				
CV(%)	36,21					

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 9- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo c-c, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	27740,44	5548,08	50,7447	3,10587	5,0643
Resíduo	12	1312	109,333			
Total	17	29052,4				
CV (%)*	17,3					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	43855,1	8771,02	91,365	3,10587	5,06432
Resíduo	12	1152	96			
Total	17	45007,1				
CV(%)	13,6					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	34355,7	6871,15	174,6904	3,10587	5,0643
Resíduo	12	472	39,333			
Total	17	34827,7				
CV(%)	9,49					

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 10- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	2297,778	459,5556	28,722	3,105	5,064
Resíduo	12	192	16			
Total	17	2489,778				
CV(%)*	15,93					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	4193,611	838,722	47,031	3,1058	5,064
Resíduo	12	214	17,833			
Total	17	4407,611				
CV(%)	17,1					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	2489,111	497,822	57,441	3,106	5,064
Resíduo	12	104	8,666			
Total	17	2593,111				
CV(%)	10,99					

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 11- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c, após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Experimento 1						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	32810,6	6562,133	68,99439	3,105872	5,0643
Resíduo	12	1141,33	95,11111			
Total	17	33952				
CV(%)	10,76					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	47676,44	9535,289	55,294	3,106	5,064
Resíduo	12	2069,333	172,4444			
Total	17	49745,78				
CV(%)*	12,26					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	5	38591,11	7718,22	135,672	3,106	5,064
Resíduo	12	682,666	56,888			
Total	17	39273,78				
CV(%)*	7,63					

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 12- Valores de t calculado obtidos a partir do teste de correlação das variáveis Densidade (DC), tempo de máxima germinação (TMG) e percentual de germinação conidial (GC) e de formação de apressórios (FA) e apressórios melanizados (FAM), formação de tubos de anastomose conidial (TAC) total, com conexão do tipo tubo-tubo (t-t), conídio conídio (c-c) e tubo conídio (t-c) de *Colletotrichum* spp., após 24h de incubação sobre lâminas de poliestireno.

Variáveis	DC	TGM	GC	FA	FAM	t-t	c-c	t-c	TAC total
TAC total	0,12	0,08	0,25	1,05	4,75	1,03	7,88	3,33	
t-c	0,02	0,01	0,06	0,68	2,19	3,54	1,71		
c-c	0,28	0,12	0,29	0,94	3,96	0,39			
t-t	0,34	0,02	0,01	0,41	0,81				
FAM	0,06	0,10	0,75	2,07					
FA	0,29	1,08	13,09						
GC	0,42	1,05							
TGM	0,33								
DC									

Anexo 13- Desenvolvimento de tubos de anastomose conidial (TACs) totais e com conexão do tipo t-t, c-c, t-c, formados por *Colletotrichum* spp. da macieira, após 48h incubação sobre folhas destacadas.

Experimento 1					
Isolado	t-t	c-c	t-c	TAC (total)	
MANE 67	44,8a	204,3a	71,2a	320,3a	
MANE 143	11,0b	237,0a	32,0b	280,0a	
Experimento 2					
Isolado	t-t	c-c	t-c	TAC (total)	
MANE 67	45,4a	228,7a	49,6a	323,7a	
MANE 143	10,0b	198,0a	40,0a	248,0a	
Média Experimento 1 x Experimento 2					
Isolado	t-t	c-c	t-c	TAC (total)	
MANE 67	45,1a	216,5a	60,4a	322,0a	
MANE 143	10,5b	217,5a	36,0b	264,0a	

Anexo 14- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-t, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Experimento 1 ^a						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	0,01297	0,012	183,125	5,317	11,258
Resíduo	8	0,00056				
Total	9	0,01353				
CV(%)*	14,21					

Experimento 2 ^b						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	4,440	4,440	364,781	5,317	11,258
Resíduo	8	0,097	0,0121			
Total	9	4,537				
CV(%)	3,51					

Média Experimento 1 x Experimento 2 ^c						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	28,039	28,039	401,731	5,317	11,258
Resíduo	8	0,558	0,0697			
Total	9	28,598				
CV(%)	5,25					

^a Dados foram transformados por $1/x$

^b Dados foram transformados por \ln

^c Dados foram transformados por $\sqrt{\quad}$

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 15- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo c-c, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Experimento 1						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	608,4	608,4	0,57103	5,3176	11,258
Resíduo	8	8523,6	1065,45			
Total	9	9132				
CV(%)*	15,4					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	318,321	318,3216	0,3987	5,3176	11,258
Resíduo	8	6386,69	798,3372			
Total	9	6705,02				
	12,0					
CV(%)	6					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	446,117	446,117	1,023	5,317	11,258
Resíduo	8	3488,33	436,0417			
Total	9	3934,45				
CV(%)	9,35					

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 16- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial com conexão do tipo t-c, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Experimento 1						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	4,440	4,440	364,78	5,317	11,259
Resíduo	8	0,097	0,012			
Total	9	4,537				
CV(%)*	3,51					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	14,4	14,4	0,3103	5,31767	11,2588
Resíduo	8	371,2	46,4			
Total	9	385,6				
CV(%)	13,41					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	810	810	18,925	5,317674	11,25884
Resíduo	8	342,4	42,8			
Total	9	1152,4				
CV(%)*	12,7					

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.

Anexo 17- Análises de variância obtidas a partir da quantidade de tubos de anastomose conidial total, após 48h de incubação sobre folhas destacadas.

Experimento 1 ^a						
Causa da variação	GL*	SQ*	QM*	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	9,1.10 ⁻⁷	9,10.10 ⁻⁷	2,34902	5,3176	11,258
Resíduo	8	3,1.10 ⁻⁶	3,87.10 ⁻⁷			
Total	9	4,0.10 ⁻⁶				
CV(%)*	17,5					

Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	971,80	971,801	0,813	5,317	11,258
Resíduo	8	9562,6	1195,32			
Total	9	10534,38				
CV(%)*	11,0					

Média Experimento 1 x Experimento 2						
Causa da variação	GL	SQ	QM	F	F (5%)	F (1%)
Tratamentos	1	3694,39	3694,391	4,1490	5,317	11,258
Resíduo	8	7123,432	890,429			
Total	9	10817,82				
CV	9,85					

^a Dados foram transformados por 1/x

* CV, GL, SQ e QM representam Coeficiente de Variação, Graus de Liberdade, Soma de Quadrados e Quadrado Médio, respectivamente.