

MATHIAS FERRARI ROCKENBACH

**ESTRUTURA GENÉTICA DE *Colletotrichum fructicola* E
MECANISMOS DE DEFESA DA MACIEIRA (*Malus domestica*
Borkh.) À MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA**

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

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik.
Coorientador: Prof^ª Dr^ª. Sandra M. Alaniz.

Florianópolis, SC

2016

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

ROCKENBACH, MATHIAS

ESTRUTURA GENÉTICA DE *Colletotrichum fructicola* E
MECANISMOS DE DEFESA DA MACIEIRA (*Malus domestica* Borkh.) À
MANCHA FOLIAR DE *GLOMERELLA* / MATHIAS ROCKENBACH ;
orientador, MARCIEL STADNIK ; coorientador, SANDRA ALANIZ.
- Florianópolis, SC, 2016.

47 p.

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

Inclui referências

1. Recursos Genéticos Vegetais. 2. Patogenicidade. 3.
Genética Populacional. 4. Mecanismos de Resistência. 5.
Expressão Gênica. I. STADNIK, MARCIEL. II. ALANIZ, SANDRA.
III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV), por oferecer a oportunidade de realizar o doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos no Brasil e no Uruguai.

Ao Professor Marciel J. Stadnik pela orientação.

À Professora Sandra M. Alaniz pelo acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Fitopatologia da Facultad de Agronomía, Universidad de la República (UdelaR), em especial ao Professor Pedro Mondino.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC pela colaboração.

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

RESUMO

Colletotrichum fructicola é a principal espécie causadora de podridão amarga (PA) na macieira e da Mancha foliar de Glomerella (MFG) no Sul do Brasil e PA no Uruguai, país onde a MFG não tem sido reportada até então. Este trabalho teve como primeiro objetivo geral determinar a estrutura genética do *C. fructicola* proveniente de ambos os países. Vinte e oito (90.3%) dos 31 isolados brasileiros incluídos neste trabalho causaram sintomas típicos da MFG, enquanto apenas seis de 25 (24%) isolados uruguaios foram capazes de colonizar folhas de mudas de macieira suscetíveis (cv. Gala) à MFG, mas causando sintomas atípicos. Ambas as populações mostraram níveis similares de diversidade genética de Nei ($h = 0.088$ e $h = 0.079$ para a população brasileira e uruguaia, respectivamente) e a análise Bayesiana inferiu dois blocos genéticos que mostraram correlação com a distribuição geográfica dos isolados. Da mesma forma, a análise de coordenadas principais e o cladograma UPGMA também segregaram os isolados brasileiros e uruguaios em dois grupos. Todos os isolados uruguaios foram agrupados em um único Grupo de Compatibilidade Vegetativa (GCV) (GCV 1), enquanto que os isolados brasileiros foram agrupados em 4 GCV (GCV 1-4). Os resultados demonstraram que as populações brasileiras e uruguaias de *C. fructicola* são geneticamente diferentes e sugerem que a população brasileira causadora de MFG evoluiu independentemente da população uruguaia causadora de PA. Por outro lado, o segundo objetivo deste trabalho foi determinar se a resistência completa da macieira à MFG está associada com indução de reação de hipersensibilidade (RH), aumento da atividade enzimática antioxidante e indução da expressão dos genes *PR-1* e *PR-10*. Plantas suscetíveis apresentaram um incremento na severidade da doença das folhas mais velhas às mais jovens, demonstrando a existência na macieira de um grau de resistência do tipo ontogênica para o *C. fructicola*. Por outro lado, a germinação dos conídios e formação de apressórios tenderam a localizar-se nas junções das células epidérmicas, tanto em folhas resistentes quanto suscetíveis, sugerindo uma penetração do tipo intramural por parte deste fungo. O acúmulo de peróxido de hidrogênio nas paredes celulares

anticlinais e o associado com a RH foi relativamente baixo e não esteve associado à resistência ao *C. fructicola*. Por outro lado, as atividades enzimáticas da ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e superóxido dismutase não variaram nas plantas resistentes e suscetíveis após a inoculação. Em contraste, a enzima glutationa reductase apresentou incrementos significativos nas folhas resistentes inoculados com *C. fructicola* às 12 e 48 h.a.i. Finalmente, a expressão do gene *PR-1* não variou ao longo do tempo nas plantas resistentes, nem nas suscetíveis inoculadas com o patógeno. No entanto, a expressão do gene *PR-10* aumentou em duas, e três vezes nas plantas resistentes e suscetíveis às 24 h.a.i., respectivamente; e em quatro vezes nas plantas suscetíveis às 48 h.a.i., em relação ao controle. Em conjunto, os resultados sugerem que a resistência recessiva da macieira à MFG não está associada com o acúmulo foliar de peróxido de hidrogênio, indução da RH e incremento na expressão do gene *PR-1*.

Palavras-chave: *Malus domestica*. *Colletotrichum fructicola*. Genética Populacional. Grupos de Compatibilidade Vegetativa. Resposta Hipersensitiva. Genes Relacionados à Patogenicidade.

ABSTRACT

C. fructicola is the main species causing apple bitter rot (ABR) and Glomerella leaf spot (GLS) in southern Brazil, and ABR in Uruguay where GLS remains unnoticed. This work aimed firstly to determine the genetic structure of *C. fructicola* species causing ABR and GLS in both countries. Twenty-eight from 31 brazilian isolates caused typical symptoms of GLS, while only six of 25 uruguayan isolates originating from fruits were able to infect leaves, but causing atypical symptoms. Both populations showed similar levels of Nei's gene diversity ($h = 0.088$ and $h = 0.079$, for brazilian and uruguayan populations, respectively), and Bayesian cluster analysis inferred two genetic clusters correlated with the geographical origin of isolates. A principal coordinates analysis (PCoA) scatter plot, and a (UPGMA)-based dendrogram, also grouped brazilian and uruguayan isolates into two groups. By pairwise comparison of nitrate-non-utilizing (*nit*) mutants with a proposed set of testers, all uruguayan isolates were grouped into a unique vegetative compatibility group (namely VCG1), while brazilian into four VCGs (VCG1-4). Brazilian and uruguayan populations of *C. fructicola* were revealed to be genetically distinct, and suggest that isolates of *C. fructicola* from Brazil capable of causing GLS and ABR arose independently of those from Uruguay. By other hand, the second objective of this work was to asses if complete resistance of apple to GLS is associated to leaf accumulation of hydrogen peroxide, induction of hypersensitive responses (HR), and expression of *PR-1* and *PR-10* genes. Susceptible plants showed increasing leaf necrosis from older to younger leaves, demonstrating the expression of an ontogenic resistance to GLS. Most conidia and appressoria were developed on anticlinal cell walls, and the number of attempted penetration sites was similar in resistant and susceptible leaves. Enzymatic activity of ascorbate peroxidase, guaiacol peroxidase and superoxide dismutase were similar in resistant and susceptible leaves inoculated with *C. fructicola*, and accordingly, leaf accumulation of hydrogen peroxide was low and not associated with resistance. However, enzymatic activity of glutathione reductase was increased in resistant leaves at 12 and at 48 h.a.i with

pathogen. Finally, the *PR-1* gene showed a constitutive expression in the both resistant and susceptible leaves that was not affected by inoculation with *C. fructicola*. However, relative expression of *PR-10* was up-regulated in the both resistant and susceptible leaves at 24, and in susceptible ones at 48 h.a.i. Results suggest that recessive resistance of apple to leaf infection by *C. fructicola* acts independently of hypersensitive reaction and expression of *PR-1* gene.

Keywords: *Malus domestica*. *Colletotrichum fructicola*. Population Biology. Vegetative Compatibility Groups. Hypersensitive Response. Pathogenesis-related Genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa das áreas de produção de maçã no Sul do Brasil e Uruguai. As linhas pontilhadas delimitam as áreas de produção de cada país. CA: Canelones; MO: Montevideo; PR: Paraná; RS: rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SJ: San José. Fonte: VELHO et al., 2015. .22

Figura 2: Sintomas da podridão amarga (A) e da mancha foliar de *Glomerella* (MFG) (B) causados por *C. fruticola*.23

Figura 3: Modelos de infecção hemibiotrófico descrito para *Colletotrichum higginsianum* de *Arabidopsis* (A) e *Colletotrichum graminicola* do milho (*Zea mays*) (B). Em ambos os casos, o esporo germina, forma um apressório e inicia uma infecção intracelular do tipo biotrófico nas células epidérmicas mediante o desenvolvimento de hifas primárias. Posteriormente, o patógeno muda seu estilo de vida para necrotrófico e passa a matar o tecido hospedeiro mediante o desenvolvimento de hifas secundárias. AP: Apressório; PH: Hifa primária; SP: Esporo; SH: Hifa secundária. Fonte: O'CONNELL et al., 2012.....26

Figura 4: Modelo 'zig-zag' do sistema imune das plantas ativado contra patógenos. Padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelo hospedeiro, os quais ativam a denominada imunidade ativada por PAMPs (PTI). Em resposta, o patógeno libera efetores de virulência que podem bloquear a PTI e tornar o hospedeiro suscetível (ETS). No entanto, o hospedeiro pode reconhecer tais efetores patogênicos mediante a expressão de proteínas *R* e ativar um estado de resistência disparada por efetores (ETI). ETI: Imunidade disparada por efetores patogênicos; ETS: Suscetibilidade disparada por efetores; HR: Resposta de hipersensibilidade; PTI: Imunidade disparada por PAMPs. Fonte: JONES e DANGL, 2006.28

Figura 5: Possíveis fontes e envolvimento das espécies reativas de oxigênio nas respostas de defesa contra patógenos biotróficos e necrotróficos. Fonte: SHETTY et al., 2008.....30

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABR** Podridão amarga na macieira (*Apple bitter rot*)
- AFLP** Polimorfismo de comprimento de fragmentos
- AJ** Ácido jasmônico
- amplificados (*Amplified fragment length polymorphism*)
- APX** Ascorbato peroxidase (*Ascorbate peroxidase*)
- AS** Ácido salicílico
- ATP** Trifosfato de adenosina (*Adenine triphosphate*)
- DAB** Diaminobenzidina (*Diaminobenzidine*)
- DNA** Ácido desoxirribonucléico (*Deoxyribonucleic acid*)
- ERO** Espécies reativas de oxigênio
- ET** Etileno
- ETI** Imunidade ativada por efetores (*Effector-triggered immunity*)
- ETS** Suscetibilidade ativada por efetores (*Effector-triggered susceptibility*)
- GCV** Grupos de compatibilidade vegetativa
- GLS** Mancha foliar de *Glomerella* (*Glomerella leaf spot*)
- GPOD** Guaiacol peroxidase
- GR** Glutathione redutase (*Glutathione reductase*)
- GTP** Trifosfato de guanossina (*Guanosine triphosphate*)
- HAI** Horas após inoculação (*Hours after inoculation*)
- HR** Reação de hipersensibilidade (*Hypersensitivity reaction*)
- ISSR** Sequências internas simples repetidas (*Inter-Simple Sequence Repeat*)
- LRR** Repetidos ricos em leucinas (*Leucine-rich repeats*)
- MANE** Micoteca Anne Lore Schroeder

MFG Mancha foliar de Glomerella

NBS Local de ligação de nucleotídeos (*Nucleotide-binding site*)

NO Óxido nítrico (*Nitric oxid*)

PA Podridão amarga

PAMP Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-associated molecular pattern*)

PCR Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)

POX Peroxidase

PR Relacionadas à patogênese (*Pathogenesis-related*)

PTI Imunidade disparada por padrões moleculares associados aos patógenos (*PAMP-triggered immunity*)

RAPD Amplificação aleatória de DNA polimórfico (*Random amplification of polymorphic DNA*)

RFLP Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição (*Restriction fragment length polymorphism*)

RH Reação de hipersensibilidade

SAR Resistência sistêmica adquirida (*Systemic acquired resistance*)

SOD Superóxido dismutase (*Superoxide dismutase*)

UPGMA Método de grupos pareados não ponderados baseados na média aritmética (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*)

VCG Grupos de compatibilidade vegetativa (*Vegetative compatibility groups*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral	19
2.2	Objetivos específicos	19
3	CAPÍTULO I – Revisão da literatura	21
3.1	A podridão amarga e a mancha foliar de <i>Glomerella</i>	21
3.2	Metodologias aplicadas nos estudos populacionais de <i>Colletotrichum</i> spp.....	23
3.3	Modelos de infecção de <i>Colletotrichum</i> spp.....	25
3.4	Sistemas de defesa das plantas	27
4	CAPÍTULO II - GENETIC STRUCTURE OF <i>Colletotrichum fructicola</i> ASSOCIATED TO APPLE BITTER ROT AND <i>Glomerella</i> LEAF SPOT IN SOUTHERN BRAZIL AND URUGUAY¹	33
4.1	Resumo	33
5	CAPÍTULO III - RESISTANCE OF APPLE LEAVES TO INFECTION BY <i>Colletotrichum fructicola</i> ACTS INDEPENDENTLY OF HYPERSENSITIVE REACTION AND PR-1 GENE EXPRESSION¹	35
5.1	Resumo	35
6	CONCLUSÕES GERAIS	37
7	REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma cultura com elevada importância econômica no contexto agrícola de vários países do mundo. Nos últimos cem anos, países da América do Sul tais como Brasil, Argentina, Chile e Uruguai vêm implantando progressivamente a produção de maçã a fim de ganhar destaque nos mercados nacionais e internacionais. Atualmente, o Brasil tem atingido produções de maçã que superam um milhão de toneladas anuais (FAOSTAT, 2014), sendo os estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul os responsáveis por aproximadamente 95% da produção total nacional (IBGE, 2013).

Apesar do importante incremento na produção de maçãs no Brasil nas últimas décadas, esta cultura encontra-se sujeita a diversos fatores ambientais que, de fato, afetam negativamente sua produtividade. O sul do Brasil possui um clima subtropical temperado com relativamente baixos números de horas-frio, alta umidade e elevados índices de precipitações principalmente nas estações de produção e colheita da maçã. Estas condições ambientais são altamente favoráveis para a ocorrência de doenças ocasionadas por fungos (MONDINO et al., 2009), os quais podem chegar a comprometer tanto a produção quanto a vida das macieiras.

Entre as principais doenças da macieira causadas por fungos no Brasil, destacam-se a Podridão Amarga (PA) e a Mancha Foliar da *Glomerella* (MFG) (VELHO et al., 2015). Ambas estão disseminadas por toda a região Sul do país e podem ocorrer inclusive no mesmo pomar quando as condições ambientais são altamente favoráveis para o desenvolvimento do patógeno (VELHO et al., 2015). A PA encontra-se disseminada em várias regiões produtoras ao redor do mundo, enquanto que a MFG é uma doença emergente que tem surgido de forma aparentemente independente em países distantes entre si tais como China (WANG et al., 2015), EUA (TAYLOR et al., 1971) e Brasil (LEITE et al., 1988). Na América do Sul, apesar da relativa proximidade entre os países produtores, a MFG parece ser até então uma doença exclusiva e de alto impacto somente no sul do Brasil.

Não estão completamente esclarecidas as causas que favorecem o surgimento e estabelecimento dos patógenos causadores de MFG em regiões tão distantes entre si. A complexidade consiste em compreender porque essa doença não ocorre em países vizinhos ao Brasil, como o Uruguai, com o qual tem havido grandes fluxos de frutos e materiais vegetais propagativos ao longo de décadas (MAPA, 2015). Embora as condições geográficas e climáticas destes países sejam diferentes, o intercâmbio descontrolado de materiais vegetais pode ser um mecanismo potencial de disseminação dos patógenos (CRUSIUS et al., 2002), os quais podem evoluir e tornar-se patogênicos em condições climáticas onde previamente não o eram (DOYLE et al., 2013). Assim, o estudo da distribuição geográfica das populações altamente agressivas de *C. fructicola* causadoras de MFG, permitiria compreender suas dinâmicas populacionais e evitar a propagação desta doença mediante estratégias de controle (McDONALD e LINDE, 2002).

Várias espécies de *Colletotrichum* associadas à PA no Uruguai e à PA e MFG no Brasil foram recentemente identificadas mediante técnicas moleculares baseadas no seqüenciamento gênico multilocus (VELHO et al., 2015). Entretanto, outras abordagens metodológicas deveriam ser consideradas para resolver questões a nível populacional da espécie *C. fructicola* com maior precisão, principalmente aquelas que permitam a detecção de polimorfismo ao nível de indivíduo (WOLFE e LISTON, 1998). Neste sentido, a determinação da estrutura genética de *C. fructicola* associado à PA e MFG elucidará as relações genéticas entre essas populações e as possíveis correspondências com suas distribuições geográficas e/ou preferências por tecidos hospedeiros.

Um dos principais problemas que enfrentam atualmente os produtores de maçã do Brasil são os elevados níveis de produtos químicos que devem ser aplicados sobre as macieiras para combater a MFG (ARAÚJO et al., 2008), o qual aumenta o risco de exposição do consumidor ao resíduo químico presente no fruto e encarece tanto sua produção, quanto seu consumo. Praticamente todas as cultivares de maçã produzidas no Brasil parecem ser suscetíveis em alguma medida à PA, incluindo as cultivares resistentes à MFG como a cv. Fuji (DENARDI et al., 2003). Este problema é exacerbado pelo fato de que

mais da metade da produção nacional está focada na produção da cv. Gala, a qual é altamente suscetível à MFG (ARAÚJO e STADNIK, 2013).

Trabalhos recentes têm demonstrado que a resistência completa (vertical) da cv. Fuji à MFG é monogênica para *R* (LIU et al., 2015; ROCKENBACH et al., 2015). Evidências genéticas apontam que a resistência é regulada apenas por um único gene recessivo (LIU et al., 2015). Várias proteínas supostamente do tipo *R* (proteínas do tipo NBS-LRR) foram também identificadas em folhas da cv. Fuji em resposta ao *C. fructicola* (ROCKENBACH et al., 2015). Entretanto, não está completamente esclarecido se respostas de defesa tais como explosão oxidativa, reação de hipersensibilidade, e acúmulo de proteínas *PR* estão associadas à resistência completa da cv. Fuji às populações de *C. fructicola* causadoras de MFG.

Este trabalho teve como objetivos determinar a estrutura genética do *C. fructicola* causador de MFG e/ou PA no Brasil e Uruguai e, estudar se a resistência completa da cv. Fuji à MFG está relacionada com mecanismos de defesa associados à explosão oxidativa, reação de hipersensibilidade e indução de genes relacionados à patogenicidade (genes *PR*).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Determinar a estrutura genética do *C. fruticola* associado à MFG ou PA no sul do Brasil e Uruguai e, estudar os mecanismos de resistência da planta à MFG.

2.2 Objetivos específicos

- i) Determinar si existem diferenças genéticas entre populações brasileiras e uruguaias de *C. fruticola* causadoras de MFG e/ou PA;
- ii) Estudar os mecanismos de resistência em folhas de macieira à MFG.

3 CAPÍTULO I – Revisão da literatura

3.1 A podridão amarga e a mancha foliar de *Glomerella*

A maçã é uma fruta de grande importância econômica em vários países da América do Sul e do mundo. Sua produção vem mostrando incrementos contínuos nos últimos anos, entretanto, a ocorrência de doenças é uma das principais causas de perdas que afetam todas as regiões produtoras. No sul do Brasil e Uruguai, a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a podridão amarga (PA) são duas das principais doenças que atacam a cultura da macieira, respectivamente (ALANIZ et al., 2012; VELHO et al., 2015) (Figura 1). Ambas são causadas predominantemente pela espécie *C. fructicola* Prihast. L. Cai & K.D. Hyde 2009 (PRIHASTUTI et al., 2009), embora outras espécies também têm sido reportadas como agentes causais da PA e MFG (VELHO et al., 2015).

A PA causa perdas significativas na maior parte das regiões produtoras de maçã (SUTTON et al., 1992). Os sintomas são descritos como lesões iniciais de cor marrom clara, que crescem ao longo do tempo até adquirir coloração marrom escuro (Figura 2). As lesões crescem em direção ao interior do fruto em padrões com forma de “V” e quando atingem tamanhos consideráveis é possível observar esporulações (acérvulos) cor de rosa dispostos em anéis concêntricos (SUTTON et al., 1992; MONDINO et al., 2009). A grande maioria das cultivares de macieira implantadas no Brasil são consideradas suscetíveis à PA (DENARDI et al., 2003).

Por outro lado, a ocorrência da MFG encontra-se limitada a poucas regiões ao redor do mundo tais como o sudeste dos EUA (TAYLOR et al., 1971), o sul do Brasil (VELHO et al., 2015) e sudeste da China (WANG et al., 2015). No Brasil, a MFG foi descrita pela primeira vez em 1983 e, desde então, tem se propagado por todas as regiões com produção de maçã (LEITE et al., 1988). Os sintomas da MFG consistem em manchas cor vermelho-arroxeadas que aparecem



Figura 1: Mapa das áreas de produção de maçã no Sul do Brasil e Uruguai. As linhas pontilhadas delimitam as áreas de produção de cada país. CA: Canelones; MO: Montevidéu; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; SC: Santa Catarina; SJ: San José. Fonte: VELHO et al., 2015.

por volta das 48 horas após o contato com o patógeno, as quais evoluem para manchas necróticas causando o amarelecimento e senescência das folhas (ARAÚJO e STADNIK, 2013) (Figura 2). Nos frutos, patógenos causadores de MFG podem causar pequenas lesões de pouca profundidade (1-3 mm) que raramente evoluem para podridão (VELHO et al., 2015). Sabe-se que cultivares descendentes do grupo das ‘Golden delicious’ são altamente suscetíveis à MFG, enquanto que as variedades descendentes do grupo das ‘Red Delicious’ tais como a cv. Fuji são completamente resistentes (ARAÚJO e STADNIK, 2013).

As causas que têm levado a emergência da MFG em países tão distantes entre si mas não no Uruguai, não estão ainda completamente esclarecidas. A determinação da estrutura genética do *C. fructicola* permitiria compreender o impacto das condições ambientais e barreiras geográficas na distribuição mundial das populações patogênicas de folhas e frutos (McDERMOTT e McDONALD, 1993). Além disso, ajudaria a esclarecer como forças evolutivas tais como seleção,

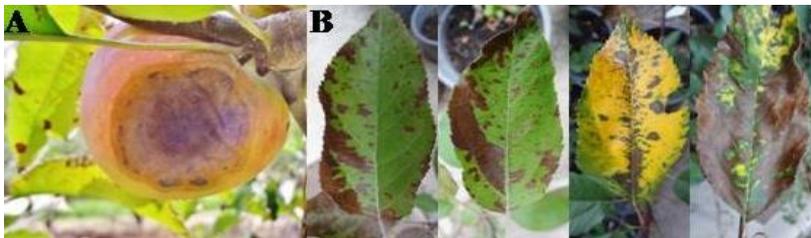


Figura 2: Sintomas da podridão amarga em frutos(A) e da mancha foliar de *Glomerella* em folhas (B) causados por *Colletotrichum fructicola*.

recombinação e fluxo gênico afetam a persistência e viabilidade de isolados com alta agressividade (McDERMOTT e McDONALD, 1993).

3.2 Metodologias aplicadas nos estudos populacionais de *Colletotrichum* spp.

Colletotrichum é um gênero de fungos anamorfos haplóides do filo Ascomycota, integrado por mais de 60 espécies reconhecidas capazes de causar doença sobre diversos hospedeiros (HYDE et al., 2009). Atualmente as espécies são agrupadas em complexos de espécies, cujos membros podem aparentar semelhanças morfológicas, patogênicas ou especificidade de hospedeiro, enquanto possuem diferentes níveis de homogeneidade genética (DAMM et al., 2010; WEIR et al., 2012). A caracterização das espécies é realizada mediante o uso de abordagens moleculares associadas a técnicas complementares. As análises comparativas de sequências gênicas multilocus têm permitido a identificação de espécies de *Colletotrichum* com relativo sucesso, entretanto, não há consenso acerca de quais genes possam ser informativos para estimativas da diversidade genética intra-específica (CAI et al., 2009; DAMM et al., 2010). Desde o desenvolvimento de técnicas moleculares tais como amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD), polimorfismos na longitude de fragmentos de restrição (RFLP), polimorfismos na longitude de fragmentos amplificados (AFLP) e análises de genes mitocondriais, estas têm sido

amplamente utilizadas em estudos populacionais de *Colletotrichum* spp. com resultados variáveis (HYDE et al., 2009).

Marcadores moleculares baseados em polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e análises baseadas no sequenciamento gênico multilocus, têm sido previamente utilizados na caracterização de populações de *Colletotrichum* causadores de PA e MFG nos EUA, Brasil e Uruguai (GONZÁLEZ et al., 2006; VELHO et al., 2015). Apesar das técnicas baseadas no sequenciamento gênico multilocus serem capazes de identificar espécies com alta precisão (VELHO et al., 2015), outras abordagens moleculares devem ser aplicadas para resolver questões taxonômicas a nível populacional intra-específico (KUMAR et al., 2011; McKAY et al., 2009; RAMPERSAD, 2013; RATANACHERDCHAI et al., 2010). Neste sentido, marcadores moleculares do tipo de sequências internas simples repetidas (ISSR) vêm sendo aplicados com frequência nos estudos de biologia populacional de *Colletotrichum* spp. Esta técnica consiste na amplificação por PCR de segmentos de DNA flanqueados por duas sequências idênticas de repetidos microssátelites orientadas em direções opostas (REDDY et al., 2002). Estas sequências são consideradas hipervariáveis, com altas taxas evolutivas, o qual permite a detecção de polimorfismos ao nível de indivíduos (WOLFE e LISTON, 1998).

Fenótipos baseados na compatibilidade vegetativa (somática) também têm sido utilizados como marcadores genéticos naturais para a detecção de variabilidade populacional de várias espécies de *Colletotrichum* (BROOKER et al., 1991; GONÇALVES et al., 2016; LESLIE et al., 1993). Indivíduos vegetativamente compatíveis são capazes de formar tubos de anastomosconidais e fundir suas hifas com o objetivo de intercambiar material genético, ou formar um micélio heterocariótico geralmente com dois núcleos funcionais simultaneamente (LESLIE et al., 1993; GONÇALVES et al., 2016). Estes indivíduos são classificados em “grupos de compatibilidade vegetativa” (GCV), os quais tendem a formar populações com elevada homogeneidade genética (LESLIE, 1993; SAUPE, 2000).

A determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa é

realizada mediante testes de complementação bioquímica, utilizando isolados mutantes incapazes de utilizar o nitrato como fonte de nitrogênio (mutantes *nit*) (BROOKER et al., 1991). Quando dois mutantes *nit* compatíveis vegetativamente e complementares conectam ou fundem os tubos de anastomoses conidiais, o micélio heterocarionte formado na zona de contato restabelece o fenótipo prototrófico (selvagem) (LESLIE, 1993). Assim, somente os isolados vegetativamente compatíveis (e complementares bioquimicamente) são capazes de formar micélio heterocariótico e passíveis de serem detectados (BROOKER et al., 1991). Esta técnica tem permitido diferenciar populações de *Colletotrichum* causadoras de PA e MFG no Brasil e EUA (GONZÁLEZ et al., 2006).

3.3 Modelos de infecção de *Colletotrichum* spp.

Uma vez que invadem seu hospedeiro, os fungos patogênicos podem utilizar diferentes estratégias para a obtenção de nutrientes (Figura 3). Por um lado, os fungos necrotróficos são aqueles que matam rapidamente as células do hospedeiro para posteriormente se alimentarem delas como saprófitas. Por outro lado, os fungos biotróficos são aqueles que mantêm relações estreitas com seus hospedeiros de forma transitória, ou por longos períodos que podem prolongar-se até a esporulação do patógeno (MENDGEN e HAHN, 2002). Atualmente, existem identificados vários modelos de colonização para patógenos biotróficos tais como colonização intercelular, subcuticular, intracelular, extracelular com haustórios dentro das células epidérmicas ou parenquimáticas. Entretanto, um tipo transitório de biotrofia também é observado durante o ciclo de colonização dos patógenos hemibiotróficos, como ocorre com a maioria das espécies do gênero *Colletotrichum* (MUNCH et al., 2008; MENDGEN e HAHN, 2002).

Várias estratégias de colonização também têm sido descritas particularmente para certas espécies de *Colletotrichum* (MUNCH et al., 2008). A maioria apresenta ciclos de vida do tipo hemibiotróficos,

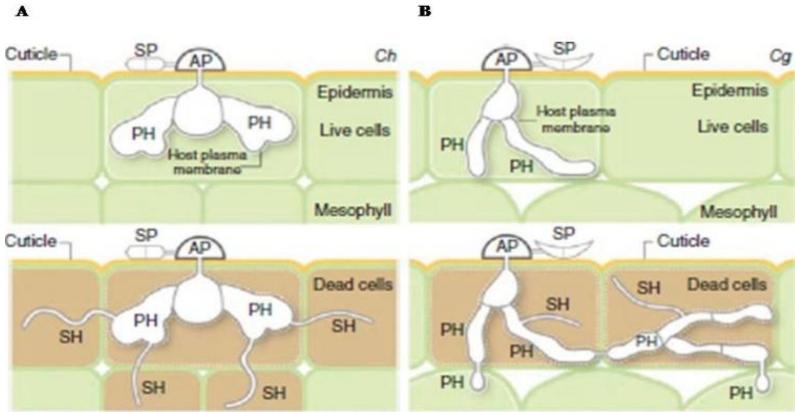


Figura 3: Modelos de infecção hemibiotrófico descrito para *Colletotrichum higginsianum* de *Arabidopsis* (A) e *Colletotrichum graminicola* do milho (*Zea mays*) (B). Em ambos os casos, o conídio germina, forma um apressório e inicia uma infecção intracelular do tipo biotrófico nas células epidérmicas mediante o desenvolvimento de hifas primárias. Posteriormente, o patógeno muda seu estilo de vida para necrotrófico e passa a matar o tecido hospedeiro mediante o desenvolvimento de hifas secundárias. AP: Apressório; PH: Hifa primária; SP: Esporo; SH: Hifa secundária. Fonte: O'CONNELL et al., 2012.

enquanto outras atuam como necrotróficos do tipo 'subcuticulares intramurais', os quais se desenvolvem transitoriamente nas paredes celulares das células epidérmicas do hospedeiro para logo colonizarem o hospedeiro como típicos necrotróficos (DIÉGUES-URIBEONDO et al., 2005). No entanto, a espécie *C. higginsianum* é considerada um modelo clássico de colonização hemibiotrófica entre as espécies de *Colletotrichum* (MUNCH et al., 2008; O'CONNELL et al., 2012; GAN et al. 2013). Após a penetração da cutícula, inicia sua colonização como patógeno biotrófico intracelularmente às células epidérmicas. Posteriormente, o patógeno muda seu estilo de vida e desenvolve hifas secundárias necrotróficas, as quais proliferam rapidamente no tecido hospedeiro causando os sintomas típicos da necrose (MENDGEN e HAHN, 2002) (Figura 3).

Não existe atualmente um modelo completo de colonização descrito para o *C. fructicola* patogênico da macieira, no entanto, os processos envolvidos desde a germinação dos conídios até a formação de apressórios são conhecidos e similares aos das demais espécies de

Colletotrichum (GONÇALVES e STADNIK, 2012; ARAÚJO et al., 2014). Geralmente os conídios iniciam sua germinação em torno das 3 horas após o contato com o patógeno e, às 12 horas já é possível observar apressórios melanizados, tanto sésseis quanto pedicelados (GONÇALVES e STADNIK, 2012; ROCKENBACH et al., 2015). Com frequência é possível observar vários apressórios por indivíduo, assim como eventos de conidiogênese microcíclica, antes mesmo do aparecimento dos sintomas da MFG (ROCKENBACH et al., 2015). Embora não exista um modelo completamente descrito, os mecanismos iniciais de infecção observados do *C. fructicola* são semelhantes aos modelos de colonização descritos para outras espécies hemibiotróficas de *Colletotrichum* (Figura 3).

3.4 Sistemas de defesa das plantas

A ativação diferencial dos sistemas de defesa nas plantas contra o ataque por patógenos é determinada basicamente pela especificidade da interação molecular patógeno-hospedeiro. De forma geral, existem descritos dois tipos de sistema de defesa nas plantas (JONES e DANGL, 2006). O primeiro, conhecido como sistema de defesa basal ou não-hospedeiro é ativado pela interação molecular entre receptores do hospedeiro e padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), tais como componentes estruturais dos patógenos (INGLE *et al.*, 2006) (Figura 4). Este mecanismo de imunidade disparado por PAMPs (PTI) é caracterizado por uma resposta rápida, inespecífica e local ao sítio de infecção, porém, as sinalizações geradas nesta resposta determinarão ou não a subsequente ativação dos mecanismos de defesa específicos aos patógenos (CHISHOLM et al., 2006; DODDS e RATHJEN, 2006).

O segundo sistema de defesa é geralmente definido como sistema de defesa mediado por genes *R*, ou disparada por efetores patogênicos (de avirulência) (ETI) (JONES e DANGL, 2006). A ativação da ETI é geralmente determinada pelo reconhecimento específico de certas moléculas liberadas pelos patógenos durante a PTI e proteínas codificadas pelos genes *R* do hospedeiro (conhecidas como

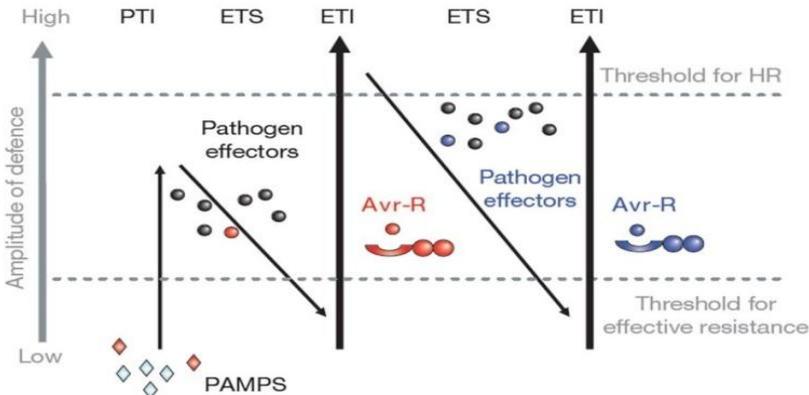


Figura 4: Modelo ‘zig-zag’ do sistema imune das plantas ativado contra patógenos. Padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) são reconhecidos pelo hospedeiro, os quais ativam a denominada imunidade ativada por PAMPs (PTI). Em resposta, o patógeno libera efetores de virulência que podem bloquear a PTI e tornar o hospedeiro suscetível (ETS). No entanto, o hospedeiro pode reconhecer tais efetores patogênicos mediante a expressão de proteínas *R* e ativar um estado de resistência disparada por efetores (ETI). ETI: Imunidade disparada por efetores patogênicos; ETS: Susceptibilidade disparada por efetores; HR: Resposta de hipersensibilidade; PTI: Imunidade disparada por PAMPs. Fonte: JONES e DANGL, 2006.

proteínas *R*) (GLAZEBROOK et al., 2005; DODDS e RATHJEN, 2006). A maioria dos genes *R* codificam para proteínas do tipo Nucleotide Binding Site (NBS), os quais unem ATP ou GTP, e do tipo Leucine Repeat (LRR), ricos em leucina e com funções de reconhecimento dos efetores. A especificidade das interações moleculares efetores-proteínas *R* determinará a ativação diferenciada dos mecanismos de defesa contra patógenos biotróficos ou necrotróficos (DODDS e RATHJEN, 2006; JONES e DANGL, 2006; VAN LOON et al., 2006).

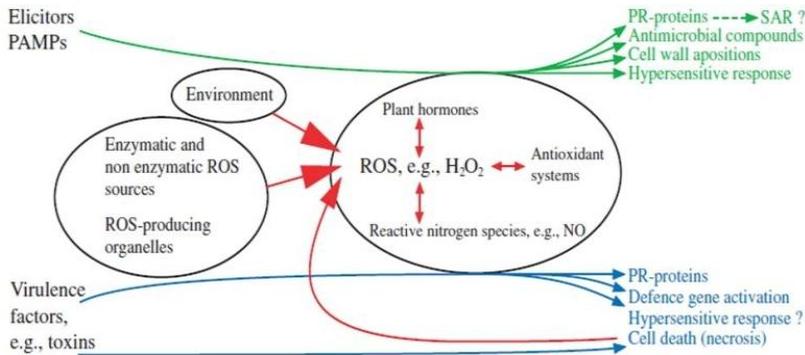
As respostas de defesa dos hospedeiros contra o ataque por patógenos geralmente envolve a síntese e acúmulo de moléculas e proteínas com ações sinalizadoras e fungitóxicas (GLAZEBROOK et al., 2005). Moléculas sinalizadoras específicas podem se translocar para sítios distais no hospedeiro e induzir estados de resistência sistêmica mediante modificações na expressão gênica. Uma das moléculas

sinalizadoras mais estudadas é o ácido salicílico (AS), amplamente envolvido nas respostas locais e sistêmicas principalmente contra patógenos biotróficos (VLOT et al., 2009). Nestes casos, a ativação da ETI envolve a síntese de espécies reativas de oxigênio (ERO) e o acúmulo de AS nos sítios locais da infecção e, posteriormente, a repressão da morte celular dependente de AS nas regiões próximas ao sítio de infecção (SHETTY et al., 2008). Por outro lado, o etileno (ET) e o ácido jasmônico (AJ) estão mais relacionados nas sinalizações moleculares envolvidas nas respostas de defesa contra patógenos necrotróficos (GLAZEBROOK et al., 2005), no entanto não se pode descartar que outras moléculas sinalizadoras possam estar envolvidas nas respostas contra patógenos hemibiotróficos durante o estágio necrotrófico.

A resposta conhecida como explosão oxidativa consiste na síntese e acúmulo de ERO com atividades fungitóxicas tais como ânion superóxido (O_2^-), radicais de hidroxila (OH^\cdot), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO), no local da infecção do patógeno (Figura 5) (THORDAL-CHRISTENSEN et al., 1997; GREENBERG e YAO, 2004; SHETTY et al., 2008). Os acúmulos de H_2O_2 e O_2^- são eliminados por enzimas peroxidases (POX) e superóxido-dismutases (SOD), respectivamente, a fim de manter uma homeostase redox por abaixo de um limiar tóxico para o hospedeiro (SHETTY et al., 2008). O acúmulo de ERO induz um tipo de morte celular programada denominada reação de hipersensibilidade (RH). Algumas RH podem ser independentes do acúmulo de H_2O_2 ou NO, e geralmente estão orientadas contra patógenos biotróficos, uma vez que a morte celular não seria um mecanismo plausível contra patógenos necrotróficos (GLAZEBROOK et al., 2005). Por outro lado, a RH pode ser ambígua contra patógenos hemibiotróficos nos estágios iniciais da infecção, considerando que estes patógenos possuem estágios necrotróficos após a fase biotrófica (CHISHOLM et al., 2006; JONES e DANGL, 2006).

Outro componente importante relacionado aos mecanismos de defesa do hospedeiro está relacionado com a função de proteínas expressadas após o contato com o patógeno, denominadas como relacionadas à patogenicidade (proteínas *PR*) (VAN LOON et al., 2006).

Biotrophic pathogens



Necrotrophic pathogens

Figura 5: Possíveis fontes e envolvimento das espécies reativas de oxigênio nas respostas de defesa contra patógenos biotróficos e necrotróficos. Fonte: SHETTY et al., 2008.

Este conjunto de proteínas é agrupado em 17 ‘famílias’, cada uma com diferentes funções antimicrobianas e atividades no metabolismo vegetal secundário, muitas das quais são induzidas nas interações compatíveis e incompatíveis mediadas por genes *R* (JONES e DANGL, 2006; VAN LOON et al, 2006). A maioria das proteínas *PR* são translocadas para o apoplasto, enquanto outras são encontradas exclusivamente no citoplasma como ocorre com as do tipo *PR-10* (JAIN e KUMAR, 2015). Além disso, as plantas são capazes de coordenar a expressão de proteínas *PR* especificamente contra patógenos biotróficos ou necrotróficos (VAN LOON et al., 2006).

As interações incompatíveis com certos patógenos são determinadas pelo acúmulo específico de certas proteínas *PR*. Por exemplo, a expressão da proteína *PR-1* é considerada como um marcador do acúmulo de AS e indução de SAR contra patógenos biotróficos (VLOT et al., 2009). Porém, trabalhos anteriores têm demonstrado que a indução de SAR em plantas demacieira não está relacionada com indução ou acúmulo de *PR-1* em macieira (GAU et al., 2004; BONASERA et al., 2006). Por outro lado, a indução da expressão do gene *PR-10* pode estar associada com vias de sinalizações mediadas

por AS, ET e AJ, durante interações compatíveis ou incompatíveis (JAIN e KUMAR, 2015), uma vez que o acúmulo de *PR-10* têm sido observado em plantas tratadas com AS ou H_2O_2 (JWA et al., 2001).

4 CAPÍTULO II - GENETIC STRUCTURE OF *Colletotrichum fructicola* ASSOCIATED TO APPLE BITTER ROT AND *Glomerella* LEAF SPOT IN SOUTHERN BRAZIL AND URUGUAY¹

Mathias Ferrari ROCKENBACH² , Aline C. VELHO² , Amanda E. GONÇALVES² , Pedro E. MONDINO³ , Sandra M. ALANIZ³ , Marciel J. STADNIK²

4.1 Resumo

Colletotrichum fructicola é a principal espécie causadora de podridão amarga (PA) da macieira e da manha foliar de *Glomerella* (MFG) no sul do Brasil, e PA no Uruguai. O objetivo deste trabalho foi determinar a estrutura genética da espécie *C. fructicola* causadora de PA e MFG no Brasil e Uruguai. Foram utilizados em total cinquenta e seis isolados de *C. fructicola* provenientes de ambos os países. Vinte e oito (90,3%) dos trinta e um isolados brasileiros causaram sintomas típicos de MFG; enquanto apenas seis (24,0%) dos 25 isolados uruguaios foram capazes de infectar folhas, neste caso causando sintomas atípicos. Ambas as populações mostraram níveis semelhantes de diversidade genética de Nei ($h = 0.088$ e $h = 0.079$, para a população brasileira e uruguaia, respectivamente) e foram agrupadas em dois grupos genéticos que mostraram correlação com a origem geográfica dos isolados. A

¹Artigo publicado no periódico *Phytopathology* (ISSN: 0031-949X) (The American Phytopathological Society. All rights reserved). doi: <http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-09-15-222-R>

²Laboratory of Plant Pathology, Agricultural Science Center, Federal University of Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga 1346, 88034-001 Florianópolis-SC, Brazil.

³Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy, University of the Republic. Av. Garzón 780, CP 12900, Montevideo, Uruguay.

análise de coordenadas principais e a análise filogenética baseada no método UPGMA também agruparam os isolados brasileiros e uruguaios em dois grupos com 78% de semelhança genética entre si pelo coeficiente DICE, com 100% de probabilidade. A determinação dos grupos de compatibilidade vegetativa (GCV) foi realizada mediante testes de complementação bioquímica utilizando isolados mutantes não utilizadores de nitrato. Todos (100%) os isolados uruguaios foram agrupados em um grupo de compatibilidade vegetativa (GCV1), enquanto que os isolados brasileiros foram agrupados em quatro GCV (GCV1-4) nas seguintes proporções: 7% no GCV1 (3,5% causadores de PA e 3,5% causadores de MFG), 60% no GCV2 (17% causadores de PA e 43% causadores de MFG), 23% no GCV3 (17% causadores de PA e 6% causadores de MFG) e 10% no GCV4 (6% causadores de PA e 4% causadores de MFG). Finalmente, a identificação dos fenótipos de crescimento em quatro fontes diferentes de nitrogênio permitiu a identificação de três tipos de mutantes *nit* (*nit1*, *nit2* e *nit3*), para os quatro pares de isolados mutantes de referência utilizados na determinação dos GCV. Os resultados demonstraram que as populações brasileiras e uruguaias de *C. fructicola* são geneticamente distintas entre si e sugerem que os isolados brasileiros causadores de MFG evoluíram a partir de populações brasileiras causadoras de PA. Por outro lado, a ausência de isolados altamente agressivos causadores de MFG no Uruguai poderia estar relacionada com as condições climáticas da região e a baixa disponibilidade de hospedeiros suscetíveis nos pomares uruguaios; no entanto, este trabalho demonstrou que já existem isolados com baixa agressividade capazes de causar sintomas atípicos da MFG.

Palavras-chave: *Malus domestica*. *Colletotrichum fructicola*. Patogenicidade. Grupos de Compatibilidade Vegetativa. Mutantes Não-utilizadores de Nitrato. Sequências Repetidas Inter-microsatélites.

5 CAPÍTULO III - RESISTANCE OF APPLE LEAVES TO INFECTION BY *Colletotrichum fructicola* ACTS INDEPENDENTLY OF HYPERSENSITIVE REACTION AND PR-1 GENE EXPRESSION¹

Mathias Ferrari ROCKENBACH² , Aline C. VELHO² , Sandra M. ALANIZ³ , Marciel J. STADNIK²

5.1 Resumo

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) é umas das doenças mais importantes que afeta a cultura da maçã no Brasil. Enquanto macieiras da cv. Gala são altamente suscetíveis à MFG, as da cv. Fuji são completamente resistentes a esta doença. O objetivo deste trabalho foi determinar se a resistência completa da macieira à MFG está associada com indução de reação de hipersensibilidade (RH), aumento da atividade enzimática antioxidante e indução da expressão dos genes *PR-1* e *PR-10*. Foram utilizadas mudas de macieira resistentes e suscetíveis à MFG com dois a três meses de idade, produzidas na proporção 1:1 a partir de sementes de 'Gala' polinizadas com 'Fuji'. As plantas foram aspergidas com inóculo de *Colletotrichum fructicola* a uma concentração de $1,0 \times 10^6$ conídios/ml, mantidas em câmara úmida durante 48 horas a 25-30°C e posteriormente em casa de vegetação durante cinco dias a temperatura ambiente. Folhas superiores (primeira a terceira folha completamente expandida) desenvolveram em média 40%

¹ Artigo submetido no periódico *Plant Pathology* (ISSN: 1365-3059) (British Society for Plant Pathology. All rights reserved).

² Laboratory of Plant Pathology, Agricultural Science Center, Federal University of Santa Catarina. Rod. Admar Gonzaga 1346, 88034-001 Florianópolis-SC, Brazil.

³ Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy, University of the Republic. Av. Garzón 780, CP 12900, Montevideo, Uruguay.

de necrose, enquanto que folhas intermediárias (quarta e quinta folha) e inferiores (sexta a oitava folha) desenvolveram em média 20% e 4% de necrose, respectivamente. Esta resistência relacionada com a idade das folhas é conhecida como ontogênica, e pode ser resultado do acúmulo de compostos antioxidantes nas folhas mais velhas. Por outro lado, a germinação dos conídios e formação de apressórios do patógeno tendeu a localizar-se nas junções das células epidérmicas, tanto em folhas resistentes quanto suscetíveis, o qual sugere uma penetração (ou tentativa de, nas plantas resistentes) intramural por parte deste fungo. O acúmulo de peróxido de hidrogênio nas paredes celulares anticlinais, e o associado com a RH foi baixo e não esteve associado à resistência ao *C. fructicola*. Entretanto, as atividades antioxidantes das enzimas ascorbato peroxidase, guaiacol peroxidase e superóxido dismutase não variaram nas plantas resistentes, nem nas suscetíveis inoculadas com o patógeno. Por outro lado, o conteúdo foliar de peróxido de hidrogênio praticamente não variou nas folhas resistentes e suscetíveis inoculadas com *C. fructicola*. Neste sentido, estes resultados e evidências anteriores parecem indicar uma modulação da resposta oxidativa no hospedeiro por parte do patógeno, durante seu estabelecimento na fase biotrófica. Finalmente, a expressão do gene *PR-1* não variou ao longo do tempo nas plantas resistentes e suscetíveis inoculadas com o patógeno. No entanto, a expressão do gene *PR-10* foi sobre-regulado em duas e três vezes nas plantas resistentes e suscetíveis às 24 h.a.i., respectivamente; e em 4 vezes nas plantas suscetíveis às 48 h.a.i. Em conjunto, os resultados sugerem que a resistência da macieira à infecção pelo *C. fructicola* não está associada com a indução da RH e indução da expressão do gene *PR-1*.

Palavras-chave: *Malus domestica*. *Colletotrichum fructicola*. Mancha Foliar de Glomerella. Resistência Ontogênica. Reação de Hipersensibilidade. Genes Relacionados à Patogenicidade.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho, demonstramos que as populações Brasileiras e Uruguaias de *C. fructicola* causadoras de PA e/ou MFG no Brasil e Uruguai são geneticamente diferentes e se encontram em estados evolutivos diferentes. As diferenças ao nível da patogenicidade, grupos de compatibilidade vegetativa e loci microssatélites, indicaram um fluxo de indivíduos muito baixo entre ambos os países que, pelo momento, não tem causado suficiente impacto no Uruguai como para o estabelecimento da MFG como uma doença emergente. Entretanto, será importante que exista um estrito controle no intercâmbio de material propagativo entre o Brasil e Uruguai com o objetivo de impedir uma possível transferência de isolados de *Colletotrichum* causadoras de MFG com alta agressividade e capacidade adaptativa. Por outro lado, neste trabalho mostramos que plantas de macieira suscetíveis à MFG apresentam resistência ontogênica a esta doença, enquanto que a resistência completa não está associada com acúmulos de peróxido de hidrogênio, indução de respostas hipersensitivas e expressão do gene *PR-1*.

REFERÊNCIAS

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

ARAÚJO, L., STADNIK, M. J., BORSATO, L. C., VALDEBENITO-SANHUEZA, R. M. **Fosfito de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira.** Tropical Plant Pathology. v. 33, n. 2, p. 148-152, 2008.

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

ARAÚJO, L., GONÇALVES, A. E., STADNIK, M. J. **Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*.** Phytoparasitica. v. 42, p. 631-640, 2014.

BROOKER, N. L., LESLIE, J. F., DICKMAN, M. B. **Nitrate non-utilizing mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness.** Phytopathology v. 81, p. 672-677, 1991.

CAI L., HYDE, K. D., TAYLOR, P. W. J., WEIR, B. S., WALLER, J., ABANG, M. M., ZHANG, J. Z., YANG, Y. L., PHOULIVONG, S., LIU, Z. Y., PRIHASTUTI, H., SHIVAS, R. G., MCKENZIE, E. H. C., JOHNSTON, P. R. **A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*.** Fungal Diversity. v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CANNON, P. F., BUDDIE, A. G., BRIDGE, P. D. **The typification of *Colletotrichum gloeosporioides***. Mycotaxon. v. 104, p. 189-204, 2008.

CHISHOLM, S. T., COAKER, G., DAY, B., STASKAWICZ, B. J. **Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response**. Cell. v. 124, p. 803-814, 2006.

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

DAMM, U., BARRONCELLI, R., CAI, L., KUBO, Y., O'CONNELL, R., WEIR, B., YOSHINO, K., CANNON, P. F. ***Colletotrichum*: species, ecology and interactions**. IMA Fungus. v. 1, p. 161–165, 2010.

DENARDI, F., BERTON, O., SPENGLER, M. M. **Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinadas pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem fermentos**. Revista Brasileira de Fruticultura. v. 25, p. 494-497, 2003.

DIÉGUEZ-URIBEONDO, J., FÖRSTER, H., SOTO-ESTRADA, A., ADASKAVEG, J. E. **Subcuticular-intracellular hemibiotrophic and intercellular necrotrophic development of *Colletotrichum acutatum* on almond**. Phytopathology. v. 95, p. 751–758, 2005.

DOYLE, V. P., OUDEMANS, P. V., REHNER, S. A., LITT, A. **Habitat and host indicate lineage identity in *Colletotrichum gloeosporioides* s.l. from wild and agricultural landscapes in North America**. PLoS One 8:e62394, 2013.

FAOSTAT, **Food and agriculture organization of the United Nations-Statistics Division**. <http://faostat3.fao.org/home/E>.

GAN, P., IKEDA, K., IRIEDA, H., NARUSAKA, M., O'CONNELL, R. J., NARUSAKA, Y., SHIRASU, K. **Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi**. *New Phytologist*. v. 197, p. 1236–1249, 2013.

GLAZEBROOK, J. **Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens**. *Annual Review of Phytopathology*. v. 43, p. 205–227, 2005.

GONÇALVES, A. E., STADNIK, M. J. **Interference of ulvan on appressoria development and melanization of *Colletotrichum gloeosporioides***. *Tropical Plant Pathology*. v. 37, p. 431–437, 2012.

GONÇALVES, A.E., VELHO, A.C., STADNIK, M.J. **Formation of conidial anastomosis and tubes melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple**. *European Journal of Plant Pathology*. 2016. DOI: 10.1007/s10658-016-0934-6.

GONZÁLEZ, E., SUTTON, T. B., CORREL, J. C. **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. 96, p. 982-992, 2006.

GREENBERG, J. T., YAO, N. **The role and regulation of programmed cell death in plant-pathogen interactions**. *Cellular Microbiology*. v. 6, p. 201-211, 2004.

HYDE, K. D., CAI, L., CANNON, P. F., CROUCH, J. A., CROUS, P. W., et al. ***Colletotrichum* – names in current use**. Fungal Diversity. v. 39, p. 147–182, 2009.

IBGE-LSPA, **Levantamento sistemático da produção agrícola**, Rio de Janeiro, v.26, n.1, p.1-83, 2013.

INGLE, R. A.; CARSTENS, M.; DENBY, K. J. **PAMP recognition and the plant-pathogen arms race**. Bioassays. v. 28, n. 9, p. 880-889, 2006.

JAIN, S., KUMAR, A. **The pathogenesis related class 10 proteins in plant defense against biotic and abiotic stresses**. Advances in Plants Agricultural Research. vol. 3, p. 00077, 2015.

JONES, J. D. G.; DANGL, J. L. **The plant immune system**. Nature. v. 444, p. 323-329, 2006.

JWA, N.-S., AGRAWAL, G. K., RAKWAL, R., PARK, C.-H., AGRAWAL, V. P. **Molecular cloning and characterization of a novel jasmonate inducible pathogenesis-related class 10 protein gene, *JIOsPR10*, from rice (*Oryza sativa* L.) seedlings leaves**. Biochemical and Biophysical Research Communication. v. 286, p. 973-983, 2001.

KUMAR, N., JHANG, T., VIR, S., SHARMA, T. R. **Molecular and pathological characterization of characterization of *Colletotrichum falcatum* infecting subtropical Indian sugarcane**. Journal of Phytopathology. v.159, p. 260-267, 2011.

LEITE JUNIOR, R.P., TSUNETTA, M., KISHINA, A.Y. **Ocorrência da**

mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná.

Londrina: IAPAR, Informe de pesquisa 81, 6p., 1988.

LESLIE, J. F. **Fungal vegetative compatibility.** Annual Review of Phytopathology. v. 31, p. 127-150, 1993.

LIU, Y.-X., LI, B.-H., WANG, C.-H., LIU, C.-X., KONG, X.-H., ZHU, J., DAI, H.-Y. **Genetic studies and molecular markers screening of apple resistance to *Glomerella* leaf spot.** Acta Horticultural Sinica. v. 42, p. 2105-2112, 2015.

MAPA. 2015. **Lista de Produtos Vegetais de Importação Autorizada (PVIA).** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (<http://www.agricultura.gov.br>). Publicado online.

MCDERMOTT, J. M., MCDONALD, B. A. **Gene flow in plant pathosystems.** Annual Review of Phytopathology. v. 31, p. 353-373, 1993.

MCDONALD, B. A. **The population genetics of fungi: Tools and techniques.** Phytopathology. v. 87, p. 448-453, 1997.

MCDONALD, B. A., LINDE, C. **Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance.** Annual Review of Phytopathology. v. 40, p. 349-379, 2002.

MCKAY, S. F., FREEMAN, S., MINZ, D., MAYMON, M., SEDGLEY, M., COLLINS, G. C., SCOTT, E. S. **Morphological, genetic, and pathogenic characterization of *Colletotrichum acutatum*, the cause of**

anthracnose of almond in Australia. *Phytopathology*. v. 99, p. 985-995, 2009.

MENDGEN, K., HAHN, M. **Plant infection and the establishment of fungal biotrophy.** *TRENDS Plant Science*. PII: S1360-1385(02)02297-5.

MONDINO, P., DI MASI, S., FALCONÍ, C., MONTEALEGRE, J., HENRIQUEZ, J. L., NUNES, C., SALAZAR M., STADNIK, M.J., VERO, S., USALL, J. **Manual de identificación de enfermedades de manzana en poscosecha.** Udelar-Cyted, 67p., 2009.

MÜNCH, S., LINGNER, U., FLOSS, D. S., LUDWIG, N., SAUER, N., DEISING, H. B. **The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species.** *Journal of Plant Physiology*. v. 165, n. 1, p. 41-51, 2008.

O'CONNELL, R. J., THON, M. R., HACQUARD, S., AMYOTTE, S. G., KLEEMANN, J., TORRES, M. F., et al. **Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses.** *Nature Genetics*. v. 44, n. 9, p. 1060-1065, 2012.

POUPARD, P., PARISI, L., CAMPION, C., ZIADI, S., SIMONEAU, P. **A wound and etephon-inducible *PR-10* gene subclass from apple is differentially expressed during infection with a compatible and a incompatible race of *Venturia inaequalis*.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v. 62, p. 3-12, 2003.

PRIHASTUTI, H., CAI, L., CHAN, H., MCKENZIE, E. H. C., HYDE, K. D. **Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand.** *Fungal Diversity*. v. 39, p. 89-

109, 2009.

RAMPERSAD, S. N. **Genetic structure of *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato isolates infecting papaya inferred by multilocus ISSR markers.** *Phytopathology*. v. 103, p. 182-189, 2013.

RATANACHERDCHAI, K., WANG, H-K., LIN, F-C., SOYTONG, K. **ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose.** *African Journal of Microbiology Research*. v. 4, p. 76-83, 2010.

REDDY, M. P., SARLA, N., SIDDIQ, E.A. **Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding.** *Euphytica*. v. 128, p. 9-17, 2002.

ROCKENBACH, M. F., BONETI, J. I., CANGAHUALA-INOCENTE, C. G., GAVIOLI-NASCIMENTO, M. C. A., GUERRA, M. P. **Histological and proteomic analysis of apple defense responses to the development of *Colletotrichum gloeosporioides* on leaves.** *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v. 89, p. 97-107, 2015.

SAUPE, S. J. **Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous Ascomycetes.** *Microbiological and Molecular Biology Review*. v. 64, p. 489-502, 2000.

SHETTY, N. P., JØRGENSEN, H. J. L., JENSEN, J. D., COLLINGE, D. B., SHETTY, H. S. **Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens.** *European Journal of Plant Pathology*. v. 121, p. 267-280, 2008.

SUTTON, T. B., SANHUEZA, R. M. V. **Necrotic leaf blotch of Golden delicious – Glomerella leaf spot: a resolution of common names.** Plant Disease. v. 82, p. 267-268, 1998.

TAYLOR, J. **Epidemiology and symptomatology of apple bitter rot.** Phytopathology. v. 61, p.1028-1029, 1971.

THORDAL-CHRISTENSEN, H., ZHANG, Z., WEI, Y. D., COLLINGE, D. B. **Subcellular localization of H₂O₂ in plants - H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction.** The Plant Journal. v. 11, p. 1187-1194 1997.

VAN LOON, L. C.; REP, M.; PIETERSE C. M. J. Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology. v. 44, p. 135-162, 2006.

VELHO, A. C., ALANIZ, S., CASANOVA, L., MONDINO, P., STADNIK, M. J. **New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay.** Fungal Biology. v. 119, p. 229-244, 2015.

VLOT, A.C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. **Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease.** Annual Review of Phytopathology. v. 47, p. 177-206, 2009.

WANG, W., FU, D., ZHANG, R., SUN, G. **Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp.** Mycosystema. v. 34, p. 13-25, 2015.

WEIR, B., JOHNSTON, P. R., DAMM, U. **The *Colletotrichum***

gloeosporioides species complex. *Studies in Mycology*. v. 73, p. 115-180, 2012.

WOLFE, A. D., LISTON, A. 1998. **Contributions of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology**. Pages 43-86 in: *Plant Molecular Systematics II*. D. E. Soltis, P. S. Soltis, and J. J. Doyle, eds. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.

ZIADI, S., BRISSET, M. N., PAULIN, J. P., SIMONEAU, P. **Characterization in apple leaves of two subclasses of *PR-10* transcripts inducible by acibenzolar-S-methyl, a functional analogue of salicylic acid**. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. v. 59, p. 33-43, 2001.