

# Variação morfocultural e agressividade de *Colletotrichum fructicola* em um pomar de macieira em Fraiburgo, SC

Carolinna Vieira de Cisne<sup>1</sup>, Aline Cristina Velho<sup>2</sup>, Mathias Ferrari Rockenbach<sup>3</sup> e Marciel João Stadnik<sup>2</sup>

**Resumo** – A maçã é uma das frutas de clima temperado de maior importância para a economia do Sul do Brasil. Nessa região, as plantas são severamente afetadas pela mancha foliar de *Glomerella* (MFG), uma doença causada por espécies de *Colletotrichum*. O objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies predominantes de isolados causadores de MFG provenientes de um mesmo pomar localizado em Fraiburgo, SC e verificar se dentro dessa população existia variação nos níveis de agressividade. A identificação molecular dos isolados foi realizada mediante sequenciamento e análise da homologia das regiões ITS, TUB2, GAPDH e HIS3. Para a caracterização morfo-cultural, os isolados foram cultivados em meio BDA a 25°C e 12h de fotoperíodo durante 10 dias. Para avaliação da agressividade, plântulas suscetíveis (cv. Gala) foram inoculadas com uma suspensão contendo 1x10<sup>6</sup> conídios/ml. Todos os isolados foram identificados como *Colletotrichum fructicola*. Cerca de 50% dos isolados apresentaram micélio ralo com coloração de branco-oliva na frente e salmão no verso. Seis isolados formaram peritécios. Os conídios foram predominantemente cilíndricos com largura e comprimento médio de 4,2-4,5µm e 12,1-13,4µm, respectivamente. Os isolados foram classificados em três níveis de agressividade, sendo que o mais agressivo causou 80% de necrose em folhas. As implicações desses achados para o controle da MFG são discutidas.

**Termos para indexação:** Agressividade; *Colletotrichum* spp.; *Malus domestica* Borkh.; mancha foliar de *Glomerella*; identificação molecular.

## Morpho-cultural and aggressiveness variation of *Colletotrichum fructicola* causing *Glomerella* leaf spot in an apple orchard in Fraiburgo, SC

**Abstract** – Apple is one of the most important temperate fruit for the Southern Brazil's economy. In this region, the production is severely affected by *Glomerella* leaf spot (GLS), caused by *Colletotrichum* spp. The objective of this study was to identify the predominant species causing GLS in an apple orchard in Fraiburgo, SC and to assess whether there were isolates with different levels of aggressiveness in the population. The molecular identification was carried out by sequencing and analysis of the homology regions ITS, TUB2, GAPDH and HIS3. For morphological and cultural characterization, the isolates were cultured on PDA at 25°C and 12h of photoperiod during 10 days. Susceptible seedlings (cv. Gala) were inoculated with a solution containing 1x10<sup>6</sup> conidia/ml for aggressiveness assessing. All isolates were identified as *Colletotrichum fructicola*. Fifty percent of isolates exhibited mycelium thin with white-olive coloration and a salmon reverse. Six isolates formed perithecia. Conidia were predominantly cylindrical with width and length ranged from 4.2 to 4.5µm and 12.1 to 13.4µm, respectively. The isolates were classified into three aggressiveness levels, and one of them was highly aggressive with 80% of necrotic leaf area. Implications of these findings for disease control are discussed.

**Index terms:** Aggressiveness; *Colletotrichum* spp.; *Malus domestica* Borkh.; *Glomerella* leaf spot; molecular identification.

## Introdução

A maçã (*Malus domestica* Borkh.) é uma fruta de grande importância econômica no contexto nacional e internacional. O Brasil atualmente ocupa o 9º lugar no ranking da produção mundial, faturando mais de US\$30 milhões em exportações da fruta fresca (TREICHEL et al., 2016). No País, a produção concentra-se nos três estados da região Sul (PR, SC e RS), onde as condições climá-

ticas (temperaturas amenas no inverno e elevadas no verão) possibilitam o seu cultivo. As principais cultivares comerciais produzidas são a 'Gala' e a 'Fuji', responsáveis por aproximadamente 90% da produção nacional (PETRI et al., 2011).

Apesar de atender as exigências climáticas da cultura, a região Sul do Brasil apresenta um intenso regime pluviométrico, o que favorece a ocorrência de doenças. Entre elas, destacam-se as

doenças de primavera, como a sarna da macieira [*Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter]; e, no verão, a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a podridão amarga (PA), ambas causadas por espécies do gênero *Colletotrichum* (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999; STADNIK et al., 2009; VELHO et al., 2015).

A MFG é uma doença que se desenvolve principalmente durante verões quentes e chuvosos, com temperaturas entre 23 e 28°C e período de molha-

Recebido em 18/1/2016. Aceito para publicação em 2/12/16.

<sup>1</sup> Acadêmica do Curso de Agronomia, Laboratório de Fitopatologia, Universidade Federal de Santa Catarina/Centro de Ciências Agrárias (UFSC/CCA), C.P.476, 88034-001 Florianópolis, SC; e-mail: carolinnacisne@gmail.com.

<sup>2</sup> Engenheiro-agrônomo, Dr., Laboratório de Fitopatologia (UFSC/CCA), fone: (48)37215338, e-mail: alinecristinav@hotmail.com, marciel.stadnik@ufsc.br.

<sup>3</sup> Biólogo, Dr., Laboratório de Fitopatologia, UFSC-CCA, e-mail: mathiasferrari05@hotmail.com.

mento foliar superior a 8h (CRUSIUS et al., 2002; KATSURAYAMA & BONETI, 2010). Os sintomas iniciais são manchas marrom-avermelhadas na superfície adaxial das folhas, inicialmente visíveis entre 48 e 72h após a infecção, que evoluem para lesões necróticas irregulares, podendo ocasionar amarelecimento, desfolha intensa nas plantas (ARAÚJO & STADNIK, 2013a) e redução da produção nos anos seguintes (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999). Em frutos, a MFG causa pequenas lesões deprimidas (1-3mm) de cor marrom-claro, que geralmente não aumentam de tamanho e não evoluem para podridão (MONDINO et al., 2009). Cultivares descendentes do grupo 'Golden Delicious', como a 'Gala', são altamente suscetíveis à MFG. Por outro lado, as descendentes do grupo 'Red Delicious', como a 'Fuji' são resistentes a esta doença (KATSURAYAMA et al., 2001; ARAÚJO & STADNIK, 2013a).

A MFG é ainda restrita a regiões subtropicais, sendo que os seus primeiros relatos no Brasil remontam à década de 1980. Segundo Katsurayama & Boneti (2010), a doença se estabeleceu inicialmente em pomares comerciais na região metropolitana de Curitiba, PR, mas, logo a seguir, o patógeno se disseminou para pomares de Fraiburgo (1988/1989) e, uma década mais tarde, nas regiões mais altas de Santa Catarina. Desde então há um aumento na intensidade da doença a cada ciclo, que vem sendo relacionado a mudanças climáticas (KATSURAYAMA & BONETI, 2010), e um aumento na variabilidade do patógeno (ROCKENBACH et al., 2016). Recentemente, Velho et al. (2015) identificaram no Sul do Brasil a ocorrência de duas espécies causadoras da MFG, a saber, *Colletotrichum fructicola* Prihastuti, Cai & Hyde (antes *Colletotrichum gloeosporioides*), e *Colletotrichum karstii* Yang, Liu, Hyde & Cai, sendo a primeira predominante. Além dessas, *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds (GONZALEZ et al., 2006), *Colletotrichum fiorinae* Shivas & Tan (WALLHEAD et al., 2014) e *Colletotrichum aenigma* Weir & Johnst. (WANG et al., 2015) têm sido reportadas no Brasil, EUA e China, respectivamente.

A caracterização e a identificação de isolados de *Colletotrichum* são importantes para o conhecimento da diver-

sidade populacional das espécies patogênicas à macieira (VELHO et al., 2015), especialmente àquelas que possuem diferenças na agressividade. Além disso, a correta identificação dos isolados auxilia na elaboração de estratégias de controle da doença e no melhoramento de plantas.

Os critérios para caracterização e identificação dos isolados comumente usados são características morfológicas (tamanho e formato de conídios) e culturais (coloração de colônia, tipo de micélio, formação de setores, peritécios e crescimento micelial), associadas a testes de patogenicidade e métodos moleculares (PHOULIVONG et al., 2012; VELHO et al., 2015).

A identificação baseada no sequenciamento da região dos espaços internos transcritos do DNA ribossômico (ITS-rDNA) permite analisar filogeneticamente as espécies de *Colletotrichum* (CAI et al., 2009). Contudo, somente o uso da região ITS não se mostra eficiente para diferenciar espécies dentro de um mesmo complexo. Portanto, recomenda-se a sua aplicação em conjunto com o sequenciamento de outros genes, tais como  $\beta$ -tubulina (TUB2), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e histona 3 (HIS3) (WEIR et al., 2012).

O objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies predominantes de isolados causadores de MFG provenientes de um mesmo pomar localizado em Fraiburgo, SC, e verificar se dentro dessa população existia variação nos níveis de agressividade.

## Material e métodos

### Obtenção dos isolados

Os isolados foram obtidos a partir de amostras de folhas com sintomas de MFG, coletadas aleatoriamente de dez plantas distintas em um pomar com longo histórico da doença durante a safra 2012/2013, no município de Fraiburgo, SC (coordenadas: 27°2'40.996"S e 50°59'6.627"O).

Para o isolamento, foram retirados pequenos segmentos de tecido (2mm) da região de transição (entre o tecido sadio e o infectado), que foram superficialmente desinfetados em álcool

(70%) por 30s, hipoclorito de sódio (0,5%) durante 60s e lavados em água destilada estéril. Em seguida, o material foi transferido para placas de Petri contendo meio BDA (batata-dextrose-ágar) e incubado a 25°C, com 12h de fotoperíodo, até o aparecimento das estruturas do fungo.

Após a obtenção dos isolados com pureza genética, foi realizado cultivo monospórico, utilizando a técnica das diluições sucessivas (DHINGRA & SINCLAIR, 1995). As amostras foram novamente transferidas para placas com meio BDA e incubadas durante 10 dias.

Os isolados foram depositados na Micoteca Anne-Lore Schroeder (MANE), da UFSC/CCA, recebendo os códigos de identificação: MANE5, MANE7, MANE8, MANE9, MANE12, MANE16, MANE17, MANE26, MANE31 e MANE28. Esses foram armazenados em tiras de papel filtro a -20°C (VELHO et al., 2015).

### Identificação molecular e análise filogenética

A extração do DNA micelial foi realizada de acordo com Gupta et al. (2013), a partir de colônias cultivadas em meio BDA a 25°C durante 7 dias. A amplificação do DNA foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Quatro regiões gênicas foram selecionadas: a região ITS-rDNA, utilizando os iniciadores ITS1 e ITS4 (WHITE et al., 1990); TUB2, com iniciadores T1 e Bt2b (GLASS & DONALDSON, 1995); HIS3, com CYLH3F e CYLH3R (CROUS et al., 2004); e o GAPDH, com GDF e GDR (TEMPLETON et al., 1992). A amplificação para a região ITS foi realizada em um termociclador (T100™Bio-Rad Inc.), seguindo uma desnaturação inicial de 3min. a 94°C; seguida de 34 ciclos, em que cada ciclo consistiu de uma etapa de desnaturação de 30s a 94°C; uma etapa de anelamento de 30s a 55°C; uma etapa de extensão de 60s a 72°C; e uma extensão final de 10min. a 72°C. As amplificações de TUB2, HIS3 e GAPDH foram realizadas com a temperatura de anelamento de 52°C, 58°C e 60°C, respectivamente.

Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose (1,5%) e visualizados em luz ultravioleta, utilizando corante GelRed™ (Biotium) e ►

marcador de peso molecular de 100pb. Finalmente, os produtos da amplificação foram enviados para purificação e sequenciamento na Macrogen Inc. (Co-reia do Sul).

Para a identificação molecular, as sequências foram comparadas com as depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) com a ferramenta BLAST. Após a identificação foi realizada uma análise filogenética a partir do alinhamento multilocus com três genes combinados (ITS, TUB2 e GAPDH), utilizando o método ClustalW com auxílio do software MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013). Dezesete isolados obtidos do GenBank foram incluídos na análise como isolados de referência.

### Caracterização cultural e morfológica

Para avaliação cultural, os isolados foram cultivados em meio BDA a 25°C e 12h de fotoperíodo sob luz NUV (Near Ultra Violet) durante 10 dias. As colônias foram avaliadas visualmente de acordo com a sua coloração (frente e verso), tipo de micélio, formação de peritécios e setores (GONZALEZ et al., 2006). Colônias de aspecto cotonoso foram consideradas aquelas que exibiram micélio aéreo abundante com aspecto semelhante a algodão; enquanto que as colônias ralas tiveram micélio compacto e pouco abundante (WEIR et al., 2012). O diâmetro médio das colônias foi determinado com auxílio de um paquímetro digital, 10 dias após a repicagem (VELHO et al., 2015).

A caracterização morfológica dos conídios foi realizada a partir de uma suspensão conidial. O formato (cilíndrico, obcláveo e fusiforme) (SUTTON et al. 1992) e as dimensões (comprimento e largura) dos conídios foram avaliados com auxílio de uma lente com escala micrométrica em microscópio óptico (40x).

### Avaliação da agressividade

Plântulas suscetíveis de macieira (cv. Gala) foram cultivadas a partir de sementes e selecionadas através do teste das folhas destacadas, conforme descrito por Araújo & Stadnik (2013a). Para avaliar a agressividade de cada isolado, as plântulas foram inoculadas com uma

suspensão conidial ( $1 \times 10^6$  conídios/ml) com auxílio de uma pistola acoplada a um compressor de ar (58 psi). As plântulas permaneceram em câmara úmida (escura e com 95% de UR) por 48h, e posteriormente foram mantidas em casa de vegetação. A severidade da doença foi avaliada 10 dias após a inoculação. Para isso, as folhas foram destacadas e digitalizadas; e a porcentagem de tecido necrosado foi determinada com o Software Quant (V.1.02).

### Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental utilizado em todos os experimentos foi o inteiramente casualizado.

Para construção da árvore filogenética foram utilizados os métodos estatísticos de Máxima Verossimilhança e Máxima Parcimônia e um teste de filogenia (*bootstrap* de 1000 replicações).

Para a caracterização morfo-cultural foram utilizadas seis repetições/isolado, sendo que cada repetição foi constituída por uma placa de Petri. O formato e as dimensões dos conídios foram determinados avaliando-se 100 conídios/isolado. Na avaliação da agressividade foram utilizadas três repetições/isolado, sendo que cada repetição foi constituída por uma plântula por vaso e pelos controles.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas e agrupadas pelo teste Scott-knott ( $p \leq 0,05$ ).

## Resultados e discussão

A técnica molecular e a caracterização morfo-cultural empregada neste estudo permitiram a identificação mais precisa das espécies causadoras da MFG em um pomar de Fraiburgo, SC, e todos os isolados foram pertencentes à espécie *Colletotrichum fructicola* (Tabela 1).

A análise filogenética multilocus agrupou os isolados em quatro principais clados, sendo que os dez isolados de MFG foram agrupados no primeiro clado, juntamente aos isolados referenciais de *C. fructicola* (Figura 1), uma espécie pertencente ao complexo *C. gloeosporioides* (WEIR et al., 2012). O

complexo *C. gloeosporioides* atualmente engloba cerca de 20 espécies distintas, mas que apresentam muitas semelhanças morfo-culturais entre si. Esse fato dificulta a identificação somente por métodos morfo-culturais (PHOULIVONG et al., 2012), razão pela qual muitos isolados foram identificados anteriormente como *C. gloeosporioides sensu lato*, descrito por Von Arx (WEIR et al., 2012). Além disso, dois isolados de *C. alienum*, causadores de PA na macieira e pertencentes ao mesmo complexo, demonstraram uma grande proximidade genética com os isolados de *C. fructicola* (Figura 1).

Os isolados de *C. karstii* utilizados como referência foram agrupados no segundo clado e foram os mais aparentados com os identificados neste trabalho (Figura 1). Coincidentemente, um desses isolados (MANE72) foi recentemente identificado como causador de MFG no estado de Santa Catarina (VELHO et al., 2015). Neste caso, pode-se concluir que mesmo pertencente a outro complexo (*C. boninense*), a espécie está evolutivamente bem próxima das espécies do complexo *C. gloeosporioides* (DAMM et al., 2012). O terceiro clado reuniu isolados do complexo *C. acutatum* de três espécies distintas: *C. fioriniae*, *C. nymphaeae* (Pass.) Aa e *C. melonis* Damm, P.F. Cannon & Crous. Os isolados pertencentes a esse complexo possuem uma grande importância dentro desse patossistema, uma vez que inúmeras espécies do complexo *C. acutatum* estão associadas à PA (BRAGANÇA et al., 2016).

Para melhor visualização do grau de parentesco entre os isolados de *Colletotrichum*, foi utilizado para grupo externo um isolado geneticamente distinto pertencente à espécie *Neofabraea perennans* Kienholz, causador da podridão “olho-de-boi” em macieira (Figura 1).

As características morfo-culturais, isto é, cor da colônia, formação de peritécios, setores, assim como o formato e o tamanho dos conídios de *C. fructicola*, estão de acordo com aquelas observadas por Gonzalez et al. (2006) e Velho et al. (2015). Os isolados de *Colletotrichum* foram semelhantes em relação à coloração, sendo que a maioria apresentou colônia branco-oliva na frente e salmão no verso (Tabela 2). Em muitas

Tabela 1. Isolados de *Colletotrichum* spp. provenientes de folhas e frutos de diferentes hospedeiros e números de acesso das sequências depositadas no GenBank

Identificação		Origem			Nº de acesso ao GenBank			
Isolado	Espécie	Hospedeiro	Tecido	Local	ITS	HIS 3	GAPDH	TUB2
MANE12*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806277	KT806305	KT806300	KT806283
MANE16*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806278	KT806306	KT806299	KT806287
MANE17*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806279	KT806307	KT806298	KT806284
MANE26*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806280	KT806308	KT806297	KT806288
MANE28*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806274	KT806310	KT806296	KT806290
MANE31*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806273	KT806309	KT806295	KT806289
MANE5*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806271	KT806301	KT806294	KT806281
MANE7*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806272	KT806302	KT806293	KT806285
MANE8*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806275	KT806303	KT806292	KT806282
MANE9*	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Fraiburgo/SC/Brasil	KT806276	KT806304	KT806291	KT806286
MANE137	<i>C. nymphaeae</i>	Maçã	Fruto	Brasil	KC840351	KJ469526	KC875404	KJ473488
MANE144	<i>C. nymphaeae</i>	Maçã	Fruto	Urubici/SC/Brasil	KC840354	KJ469525	KC875407	KC473490
MANE147	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Urubici/SC/Brasil	KJ85124	KJ469502	KJ200614	KJ469467
MANE55	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	Vacaria/SC/Brasil	KJ185125	KJ469503	KJ200615	KJ469468
MANE72	<i>C. karstii</i>	Maçã	Folha	Caçador/SC/Brasil	KC876638	KJ469509	KC875408	KJ473486
PGYLQ2-14	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Folha	China	KF791594	-	KF791587	KF791601
ATCC MYA-663	<i>C. fioriniae</i>	Maçã	Fruto	USA	KM246589	-	KM252193	KM251943
C18	<i>C. melonis</i>	Maçã	Fruto	Uruguay	JN413082	KJ469541	KJ002489	KJ010939
C824	<i>C. alienum</i>	Maçã	Fruto	Nova Zelândia	JX010251	-	JX010028	JX010333
CBS159.84	<i>C. melonis</i>	Melão	Fruto	Brasil	JQ948194	JQ949185	J1948524	JQ949845
CBS453.64	<i>Neofabraea perennans</i>	Maçã	Folha	Reino Unido	KR859089	-	-	KR866102
CBS113087	<i>C. karstii</i>	Maçã	Fruto	USA	JQ005181	JQ005442	JQ005268	JQ005615
CBS112996	<i>C. acutatum</i>	Mamão	Fruto	Queensland/Austrália	JQ005776	-	JQ948677	JQ005860
CBS125396	<i>C. fioriniae</i>	Maçã	Fruto	Maryland/USA	JQ948629	JQ949290	JQ948629	JQ949950
CORCK1	<i>C. karstii</i>	Orquídea	Folha	China	HM585406	-	HM585387	HM585424
F11LJMX10	<i>C. fructicola</i>	Maçã	Fruto	China	KC012511	-	KC012507	KC012515
F11PGZH02	<i>C. alienum</i>	Maçã	Fruto	China	KF772089	-	KF772059	KF772149

\*Isolados identificados e caracterizados neste trabalho.

Abreviações: MANE: Micoteca Anne-Lore Schroeder, UFSC, Brasil; PGY: Coleção “Northwest Agriculture & Forestry University”, China; ATCC: American Type Culture Collection, EUA; CBS: Coleção “Centraalbureau voor Schimmelcultures”, Fungal Biodiversity Centre, Holanda; CORK: Coleção “Guizhou Academy of Agricultural Sciences”, China.

delas, também foi possível observar os acérvulos recobertos por uma mucilagem de cor laranja, uma característica típica do gênero (SUTTON et al., 1992). Além disso, oito isolados exibiram micélio ralo e apenas dois apresentaram micélio abundante do tipo cotonoso (Tabela 2). Houve diferença significativa entre o diâmetro final das colônias, e as mesmas foram separadas em três grupos: as de diâmetro médio  $\geq 60$ mm foram consideradas de crescimento rápido; entre 59 e 49mm crescimento intermediário; e as de diâmetro  $\leq 48$ mm, de crescimento lento (Figura 2). Seis isolados formaram peritécios em meio de cultura (MANE8, 9, 12, 17, 26 e 31)

(Tabela 2), demonstrando a presença da forma sexual *Glomerella cingulata*, com potencial para gerar indivíduos geneticamente distintos (GONZALEZ et al., 2006; ROCKENBACH et al., 2016). Além disso, somente um isolado (MANE17) apresentou formação de setores – comportamento esperado, tendo em vista que os isolados são monospóricos e que a formação de setores pode ser um indicativo de uma possível ocorrência de mutação (Tabela 2).

Os isolados apresentaram em média 90% dos conídios com formato cilíndrico, exceto o MANE8, que apresentou características distintas. A largura e o comprimento médio dos conídios foi

4,2-4,5 $\mu$ m e 12,1-13,4 $\mu$ m, respectivamente (Tabela 3).

Todos os isolados foram patogênicos em plântulas de macieira, produzindo sintomas de mancha foliar de *Glomerella* 48h após a inoculação, porém exibiram diferenças marcantes quanto aos níveis de agressividade (Figura 3). Três isolados (MANE5, 9 e 28) foram considerados pouco agressivos, apresentando em média 1,3% de área foliar necrosada (Figura 4A); e seis isolados (MANE7, 8, 12, 16, 17 e 31) foram medianamente agressivos, exibindo aproximadamente 30% (Figura 4B). Por outro lado, o isolado MANE26 foi altamente agressivo, causando, após 10 dias, 80% de área fo-

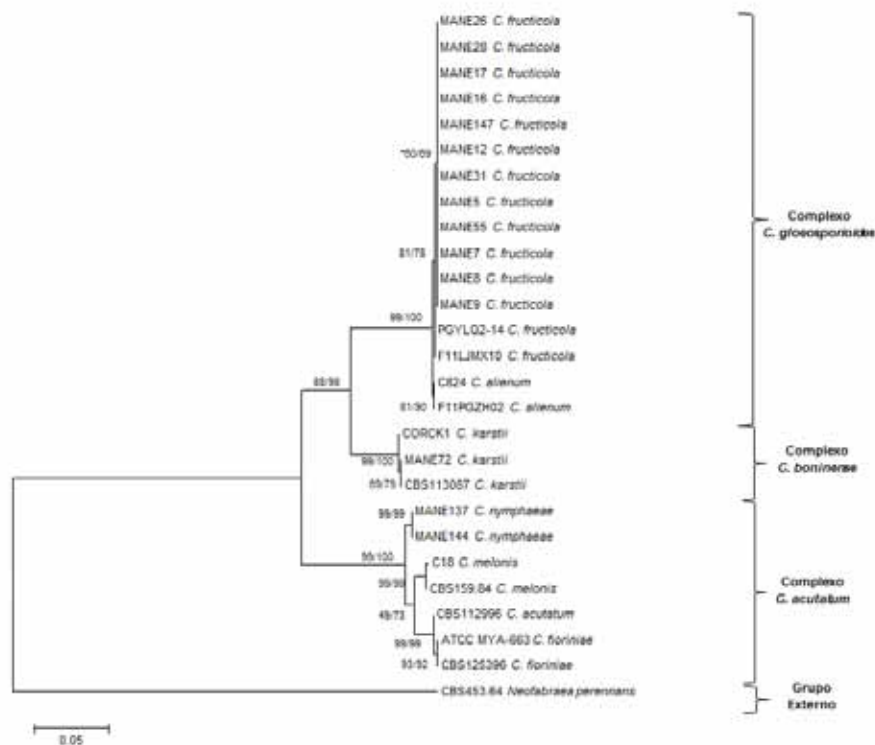


Figura 1. Árvore filogenética de máxima verossimilhança inferida a partir do alinhamento multilocus das sequências dos genes ITS (Espaços internos transcritos), GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e TUB2 ( $\beta$ -tubulina). Modelo Tamura-nei. \*Valor de bootstrap (1000 replicações) de Máxima Verossimilhança/Máxima Parcimônia

Tabela 2. Aspecto de colônia de isolados de *Colletotrichum fructicola* cultivados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-água) a 25°C e 12h de fotoperíodo sob luz NUV durante 10 dias

Isolado	Cor da colônia		Cor da borda	Tipo de micélio	Formação de peritécios	Formação de setores
	Frente	Verso				
MANE5	Branco	Branco	Branca	Ralo	Não	Não
MANE7	Branco com Oliva	Branco	Branca	Ralo	Não	Não
MANE8	Branco com Oliva	Salmão	Branca	Ralo	Sim	Não
MANE9	Branco com Oliva	Branco com Oliva	Branca	Ralo	Sim	Não
MANE12	Branco com Oliva	Salmão	Branca	Ralo	Sim	Não
MANE16	Branco com Oliva	Salmão	Branca	Cotonoso	Não	Não
MANE17	Branco com Oliva	Salmão	Branca	Ralo	Sim	Sim
MANE26	Branco	Salmão	Branca	Cotonoso	Sim	Não
MANE31	Branco com Oliva	Salmão	Branca	Ralo	Sim	Não
MANE28	Branco	Salmão	Branca	Ralo	Não	Não

liar necrosada (Figura 4C).

Isolados de folhas de macieira, coletados em diferentes cidades do Sul do País e caracterizados por Velho et al. (2015), também diferiram significativamente quanto à agressividade. Apesar dos isolados de média agressividade predominarem no pomar estudado, é possível que isolados altamente agressivos possam ter sua frequência aumentada no futuro. Isso se deve ao fato de que isolados mais agressivos, como o MANE26, provocam maior área foliar necrosada sobre a qual são produzidos uma enorme quantidade de acérvulos e conídios, gerando progênie de indivíduos com as mesmas características do isolado original (SUTTON et al., 1992). Esses conídios são, por sua vez, disseminados facilmente pelas gotas de chuva dentro do pomar (CRUSIUS et al., 2002) e novamente podem infectar uma maior área foliar. Além disso, sabe-se que o patógeno também sobrevive em ramos, gemas e frutos mumificados, podendo persistir durante vários ciclos da cultura (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999; CRUSIUS et al., 2002).

Embora originados de um mesmo pomar de macieira, as diferenças nas características morfo-culturais, bem como na agressividade entre os isolados estudados, sugerem que a geração de variabilidade genética entre eles está ocorrendo. É possível que a reprodução sexual do fungo seja o principal fator responsável por essa variabilidade, pois peritécios foram facilmente encontrados em meio de cultura, mas podem também ser encontrados facilmente em folhas infectadas no pomar (GONZALEZ et al., 2006).

Sabe-se que *C. fructicola* pode formar acérvulos e peritécios em uma mesma folha infectada (VELHO et al., 2015), confirmando a possibilidade de ocorrência simultânea dos modos de reprodução assexuada e sexuada, respectivamente. Além disso, é possível que a reprodução parassexual possa também contribuir para geração de variabilidade genética, pois Araújo & Stadnik (2013b) e Gonçalves et al. (2016) descreveram a formação de tubos de anastomose conidial de *C. fructicola* sobre a superfície de folhas de macieira.

A capacidade de *C. fructicola* de facilmente gerar variabilidade genética

Tabela 3. Formato e tamanho de conídios de isolados de *Colletotrichum fructicola* cultivados em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) a 25°C e 12h de fotoperíodo durante 10 dias

Isolado	Formato (%)			Tamanho de conídios (µm)		
	Cilíndrico	Fusiforme	Obcláveo	Comprimento	Largura	Relação C/L
MANE5	90	0	10	13,0 ± 2,6	4,3 ± 0,7	3,02
MANE7	95	0	5	12,5 ± 2,5	4,3 ± 0,7	2,97
MANE8	56	26	18	12,8 ± 2,5	4,3 ± 0,7	2,97
MANE9	100	0	0	12,2 ± 1,5	4,3 ± 0,7	2,83
MANE12	90	0	10	12,5 ± 2,5	4,4 ± 0,8	2,84
MANE16	98	0	2	12,6 ± 1,7	4,3 ± 0,8	2,93
MANE17	92	4	5	12,8 ± 2,3	4,2 ± 0,7	3,04
MANE26	94	0	6	13,4 ± 2,6	4,3 ± 0,7	3,11
MANE31	90	0	10	12,8 ± 3,1	4,5 ± 0,9	2,84
MANE28	100	0	0	12,1 ± 2,2	4,4 ± 0,8	2,75

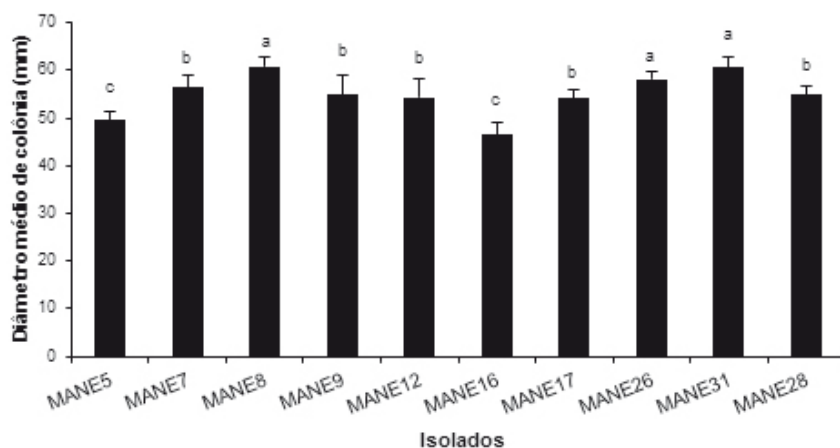


Figura 2. Diâmetro médio de colônia de isolados de *Colletotrichum fructicola* cultivados em meio BDA (batata-dextrose-ágar) a 25°C e 12h de fotoperíodo durante 10 dias. Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Skott-knott ( $p \leq 0,05$ ; CV: 7,8%). Barras representam desvio padrão

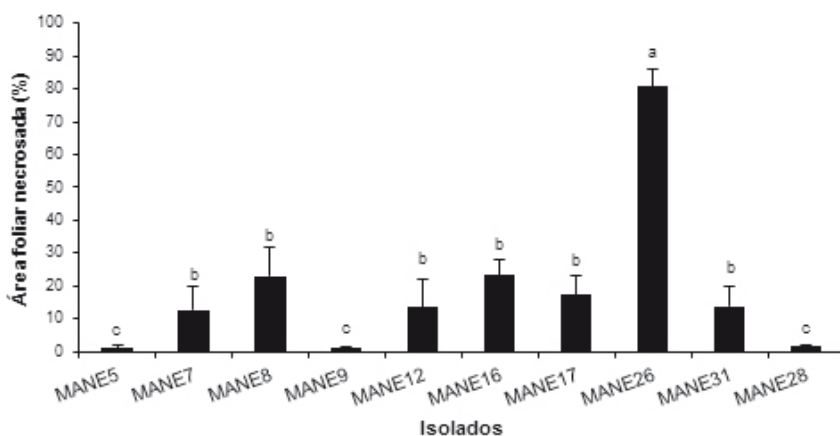


Figura 3. Área foliar necrosada (%) em plântulas de macieira 10 dias após inoculação com diferentes isolados de *Colletotrichum fructicola*. Letras iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si pelo teste Skott-knott ( $p \leq 0,05$ ; CV: 26,1%). Barras representam desvio padrão

pode contribuir para o surgimento de patótipos resistentes a fungicidas e/ou capazes de infectar cultivares até então consideradas resistentes. Como consequência, as estratégias de controle da doença, bem como os trabalhos de resistência genética à MFG podem ficar ainda mais dificultados. Contudo, mais estudos são necessários para monitorar a geração de novos patótipos na população de *C. fructicola* em pomares de macieira ao longo dos anos.

## Conclusão

Todos os isolados obtidos em um único pomar de macieira foram identificados como da espécie *C. fructicola* e apresentaram poucas variações nas características morfo-culturais. Apesar de pertencerem à mesma espécie, apresentaram diferenças marcantes quanto aos níveis de agressividade, sugerindo a ocorrência de geração de variabilidade genética entre eles.

## Agradecimentos

À engenheira-agrônoma Fabiana dos Santos (Cidasc), por coletar e enviar amostras de folhas infectadas. À Capes, pelo suporte financeiro.

## Literatura citada

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 Agronomy**, Maringá, v.35, n.3, p.287-293, 2013a.

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

BRAGANÇA, C.A.; DAMM, U.; BARONCELLI, R. et al. Species of the *Colletotrichum acutatum* complex associated with anthracnose diseases of fruit in Brazil. **Fungal biology**, v.120, n.4, 547-561, 2016.

CAI, L.; HYDE, K.D.; TAYLOR, P.W.J. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, v.39, n.1, p.183-204, 2009.

CROUS, P.W.; GAMS, W.; STALPERS, J.A. et al



Figura 4. Sintomas de mancha foliar de *Glomerella* (MFG) em plântulas de macieira (cv. Gala) 10 dias após a inoculação com isolados de *Colletotrichum fructicola* de baixa (A), média (B) e alta agressividade (C)

al. MycoBank: an online initiative to launch mycology into the 21st century. **Studies in Mycology**, v.50, n.1, p.19-22, 2004.

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

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies in Mycology**, v.73, p.1-36, 2012.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Boca Raton: CRC Press, 1995. 434p.

GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1323-1330, 1995.

GONÇALVES, A.E.; VELHO, A.C.; STADNIK, M.J. Formation of conidial anastomosis tubes and melanization of appressoria are antagonistic processes in *Colletotrichum* spp. from apple. **European Journal of Plant Pathology**, p.1-10, 2016.

GONZALEZ, 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, n.9, p.982-992, 2006.

GUPTA, V.K.; TUOHY, M.G.; GAUR, R. Methods for high-quality DNA extraction from fungi. **A Laboratory Protocols in Fungal Biology: current methods in fungal biology**. Springer, New York, 2013, p. 403-406.

KATSURAYAMA, Y.; BONETI, J.I.S. Modelo de previsão da mancha da gala na macieira ba-

seado na temperatura e na duração do molhamento foliar. **Agropecuária Catarinense**, v.23, n.3, p.82-84, 2010.

KATSURAYAMA, Y.; TSUCHIYA, S.; BONETI, J.I.S. Herança da resistência das macieiras à mancha da Gala (*Colletotrichum gloeosporioides*). **Fitopatologia Brasileira (Suplemento)**, v.26, p.409-410, 2001.

MONDINO, P.; DI MASI, S.; FALCONÍ, C. et al. **Manual de identificación de enfermedades de manzana em poscosecha**. Udelar-Cyted, 67p., 2009.

PETRI, J.L.; LEITE, G.B.; FRANCESCATTI, M.C.E.P. Avanços na cultura da macieira no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol. especial, p.48-56, 2011.

PHOULIVONG, S.; MCKENZIE, E.H.C.; HYDE, K.D. Cross infection of *Colletotrichum* species: a case study with tropical fruits. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v.2, p.99-111, 2012.

ROCKENBACH, M.F.; VELHO, A.C.; GONÇALVES, A.E. et al. Genetic Structure of *Colletotrichum fructicola* Associated to Apple Bitter Rot and *Glomerella* Leaf Spot in Southern Brazil and Uruguay. **Phytopathology**, v.106, n.7, p.774-781, 2016.

STADNIK, M.J.; ARAÚJO, L.; VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira. **Manejo integrado de doenças da macieira**. Florianópolis, SC, 2009, p.105-126.

SUTTON, B.C.; BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. CABI, Wallingford, UK, 1992, p.1-26

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D. et al. MEGA6: molecular evolutionary genetics

analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.30, n.12, p.2725-2729, 2013.

TEMPLETON, A.R.; CRANDALL, K.A.; SING, C.F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v.132, n.2, p.619-633, 1992.

TREICHEL, M.; KIST, B.B.; SANTOS, C.E. et al. **Anuário brasileiro da fruticultura 2016**, Editora Gazeta Santa Cruz, RS, 2016. 88p.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Características e controle de *Glomerella cingulata* (*C. gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira. **Embrapa Circular Técnica**, v.54, 1999.

VELHO, A.C.; ALANIZ, S.; CASANOVA, L. et al. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. **Fungal Biology**, v.119, n.4, p.229-244, 2015.

WALLHEAD, M.; BRODERS, G.; BEAUDOIN, E. et al. Phylogenetic assessment of *Colletotrichum* species associated with bitter rot and *Glomerella* leaf spot in the northeastern US. In: **Phytopathology, APS annual meeting**, p.123-124, 2014.

WANG, W.; FU D.; ZHANG, R.; SUN, G. Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp. **Mycosystema**, v.34, n.1, 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.

WHITE, T.J.; BRUNS, T.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. **PCR Protocols: A guide to methods and applications**, v.18, p.315-322, 1990. ■