

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS

ALINE CRISTINA VELHO

**DIVERSIDADE E MECANISMOS ASSOCIADOS À
VIRULÊNCIA DE *Colletotrichum* spp. EM MACIEIRA
(*Malus domestica* BORKH.).**

Florianópolis, SC

2015

ALINE CRISTINA VELHO

**DIVERSIDADE E MECANISMOS ASSOCIADOS À
VIRULÊNCIA DE *Colletotrichum* spp. EM MACIEIRA
(*Malus domestica* BORKH.).**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Recursos Genéticos Vegetais, Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para obtenção do Grau de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Marciel J. Stadnik.

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Mondino

Florianópolis, SC

2015

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

Velho, Aline Cristina

Diversidade e mecanismos associados à virulência de
Colletotrichum spp. em macieira (Malus domestica Borkh.) /
Aline Cristina Velho ; orientador, Marciel J. Stadnik ;
coorientador, Pedro Mondino. - Florianópolis, SC, 2015.
85 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. Filogenia. 3.
Patogenicidade. 4. Enzimas extracelulares. 5. Espécies
reativas de oxigênio. I. Stadnik, Marciel J. . II.
Mondino, Pedro. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos
Vegetais. IV. Título.

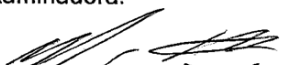
Diversidade e mecanismos associados à virulência de
Colletotrichum spp. na macieira (*Malus domestica* Borkh.)

por

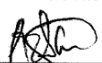
Aline Cristina Velho

Tese julgada e aprovada em 17/04/2015, em sua forma final, pelo Orientador e membros da Banca Examinadora, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração Recursos Genéticos Vegetais, no Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, CCA/UFSC.

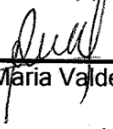
Banca Examinadora:



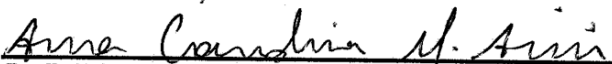
Prof. Dr. Marciel João Stadnik (Presidente - CCA-UFSC)



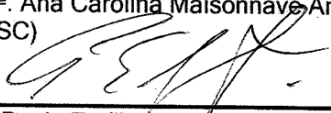
Prof.ª. Dr.ª. Sandra Alaniz (Titular Externo - FAGRO/UDELAR)



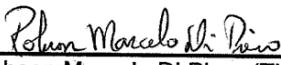
Prof.ª. Dr.ª. Rosa Maria Valdebenito Sanhueza (Titular Externo - EMBRAPA/RS)



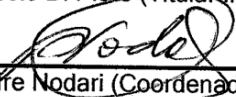
Prof.ª. Dr.ª. Ana Carolina Maisonnave Arisi (Titular Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Paulo Emílio Lovato (Titular Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Robson Marcelo Di Piero (Titular Interno - CCA/UFSC)



Prof. Dr. Rubens Onofre Nodari (Coordenador do Programa)

Florianópolis, abril de 2015

Aos meus queridos pais, Helio e Dagmar pelo apoio em todos os momentos.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais (RGV) pela oportunidade de realização do 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 por seus ensinamentos, confiança e incentivo ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fitopatologia da UFSC por toda colaboração, amizade e convivência.

A toda equipe do Laboratório de Fitopatologia da Universidad de la Republica (UdelaR), em especial o Prof. Pedro Mondino e a Prof^a. Sandra Alaniz.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para a realização dos meus sonhos, agradeço todo amor, compreensão e incentivo ao longo da minha vida.

A minha irmã Elaine e ao meu irmão Cristiano por permanecerem sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos.

Ao meu noivo Diego pelo carinho e paciência. Valeu a pena toda distância e todas as renúncias.

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

“Mesmo as noites totalmente sem estrelas podem anunciar a aurora de uma grande realização”.

Martin Luther King

DIVERSIDADE E MECANISMOS ASSOCIADOS À VIRULÊNCIA DE *Colletotrichum* spp. EM MACIEIRA (*Malus domestica* BORKH.).

RESUMO

A macieira é uma espécie frutícola de clima temperado de maior importância comercial, tanto no contexto internacional, quanto no nacional. No sul do Brasil e Uruguai, a cultura é severamente afetada por doenças típicas de clima tropical, entre elas merece destaque a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a podridão amarga (PA), ambas causadas por espécies do gênero *Colletotrichum*. A MFG e a PA podem ocorrer simultaneamente nos pomares, porém possuem muitas diferenças no que se refere à capacidade de infecção. Dessa forma, o principal objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum* que afetam as folhas e os frutos de macieira no sul do Brasil e Uruguai e investigar os principais mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de infecção em folhas. No estudo de diversidade, o sequenciamento de três regiões gênicas (ITS, GAPDH e TUB2) permitiu a identificação de três espécies causadoras de PA e MFG no Brasil, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum karstii* e *Colletotrichum nymphaeae*; e três espécies causadoras de PA no Uruguai, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum melonis*. Além disso, a análise filogenética e multivariada agrupou os isolados em três diferentes complexos de espécies, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum boninense* e *Colletotrichum acutatum*. No teste de patogenicidade em frutos, todos os isolados brasileiros provenientes de PA causaram podridão em frutos com ferimentos, mas apenas 5 em frutos sem ferimentos. No entanto, todos os isolados uruguaios causaram podridão em frutos com e sem ferimentos. Em folhas, todos os isolados brasileiros de MFG e 11 de PA foram capazes de causar mancha foliar, enquanto que somente um isolado uruaio de PA possuiu essa capacidade. Na produção de enzimas extracelulares, o isolado de PA apresentou os maiores níveis de laccase e pectina liase em meio líquido comparado ao isolado de MFG. Em folhas de macieira, o isolado de MFG apresentou apressórios predominantemente sésseis, enquanto que os de PA foram pedicelados. O isolado de PA exibiu mais conídios com múltiplos apressórios melanizados

provavelmente como um sinal das múltiplas tentativas de infecção. O acúmulo de H_2O_2 foi raramente observado nos sítios de infecção, e o escurecimento em algumas células epidérmicas não foi associado à reação de hipersensibilidade. Folhas inoculadas com o isolado de MFG aumentaram a perda de eletrólitos 48 h após a inoculação (HAI), o que reflete a transição do fungo da fase biotrófica para a necrotrófica. Em relação à atividade das enzimas envolvidas com o estresse oxidativo, os dois isolados testados aumentaram a atividade das enzimas guaiacol peroxidase, catalase e glutatona redutase, porém de forma diferenciada ao longo do tempo. A atividade da ascorbato peroxidase apresentou um aumento 6 HAI com o isolado de MFG, enquanto que a atividade da superóxido dismutase não foi afetada. Plantas inoculadas com o isolado de MFG tiveram um menor acúmulo de H_2O_2 48 HAI, o que pode indicar a eficiência das enzimas antioxidantes na eliminação de espécies reativas de oxigênio e em evitar a morte celular. Os isolados de MFG parecem ter um mecanismo para suprimir as respostas de defesa da planta.

Palavras chave: *Malus domestica* Borkh., *Colletotrichum* spp., Patogenicidade, Filogenia, Enzimas extracelulares, Estresse oxidativo, Espécies reativas de oxigênio.

DIVERSITY AND MECHANISMS ASSOCIATED WITH VIRULENCY OF *Colletotrichum* spp. IN APPLE (*Malus domestica* BORKH.)

ABSTRACT

Apple is one of the most important fruit of temperate climate in the international and national context. In Southern Brazil and Uruguay, it is severely affected by tropical climate diseases, such as, glomerella leaf spot (GLS) and apple bitter rot (ABR), both caused by *Colletotrichum* spp. GLS and ABR can occur simultaneously in orchards, but have clear differences in tissue specialization. Thus, the main objective of this work was to identify and characterize *Colletotrichum* isolates that affects leaves and fruits in Southern Brazil and Uruguay and investigate biochemical mechanisms involved during the leaf infection process. In diversity studies, sequencing of three gene regions (ITS, GAPDH and TUB2) allowed the identification of three species causing ABR and GLS in Brazil, i.e., *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum karstii*, and *Colletotrichum nymphaeae*; and three species causing ABR in Uruguay, i.e., *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum theobromicola*, and *Colletotrichum melonis*. Furthermore, phylogenetic and multivariate analysis clustered the isolates into three different species complexes, *C. gloeosporioides*, *C. boninense* and *C. acutatum*. In pathogenicity test, Brazilian isolates caused ABR in wounded fruits, but only five in non-wounded ones. Uruguayan isolates produced symptoms in fruits with or without previous wounding. All Brazilian isolates from GLS and eleven from ABR were able to cause GLS symptoms, while a sole Uruguayan ABR-isolate caused leaf spot symptom. In culture, ABR-isolate exhibited higher levels of laccase and pectin lyase, but not polygalacturonase. On leaves, GLS-isolate formed appressoria mostly sessile, while ABR-isolate pedicellate. ABR-isolate germlings formed multiple melanized appressoria probably as a sign of unsuccessful infection attempts. H₂O₂ accumulation was rarely visualized at infection sites and was not associated with hypersensitive response. GLS-isolate markedly increased the electrolyte leakage at 48 hours after infection (HAI) reflecting its transition from the biotrophic into the necrotrophic phase. Both isolates influenced differently oxidative stress enzymes,

increasing the activities of guaiacol peroxidase, catalase and glutathione reductase at different times, except for superoxide dismutase that remained unaltered. Ascorbate peroxidase activity was only affected with GLS-isolate at 6 HAI. GLS-isolate reduced H₂O₂ accumulation in leaves at 48 HAI, suggesting that antioxidative enzymes act more efficiently in scavenging reactive oxygen species and avoiding cell death. GLS-isolate seems, therefore, to have a mechanism to suppress plant defence responses.

Keywords: *Malus domestica* Borkh., *Colletotrichum* spp.; Pathogenicity, Phylogeny, Extracellular enzymes, Oxidative stress, Reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1. Sintomas típicos da mancha foliar de glomerella (MFG) em folhas da cultivar 'Gala'. (A) Sintomas típicos que ocorrem 4-5 dias após a infecção; (B) Manchas necróticas associadas com amarelecimento das folhas 10 dias após a infecção; (C) Sintomas da MFG em diferentes estágios de desenvolvimento.....30

Figura 2. Sintomas típicos de podridão amarga (PA) em frutos da cv. Cripps Pink onde é possível observar lesão circular de cor castanho-claro de aspecto deprimido, e os acérvulos dispostos em anéis concêntricos.....31

Figura 3. (A) Acérvulos envolvidos por uma matriz gelatinosa na superfície de uma folha de macieira infectada com um isolado causador da mancha foliar de glomerella (MFG); (B) Acérvulo visto em corte transversal (B).....34

Figura 4. Estratégias de infecção utilizadas pelas espécies do gênero *Colletotrichum*. (A) Intracelular hemibiotrófica; (B) Subcuticular intramural necrotrófica.....35

Capítulo 2

Figure 1. Enzyme activities of Laccase (A), Pectin lyase (B) and Polygalacturonase (C) of *Colletotrichum fructicola* isolates grown in broth medium at ± 25 °C and 12 h photoperiod under fluorescent light for 10 days.....56

Figure 2. Severity of Glomerella leaf spot (GLS) in apple seedlings 10 days after inoculation with pathogenic *Colletotrichum fructicola* isolates. The severity of upper and lower leaves was determined using the software Quant[®].....56

Figure 3. Histochemical detection of H₂O₂ accumulation in susceptible apple leaves 48 hours after inoculation (HAI) with *Colletotrichum fructicola* (GLS-isolate) (A) H₂O₂ accumulation in some parts of the anticlinal cell wall and not associated to

conidia and appressoria formation; (B) H₂O₂ accumulation in epidermal cell. The brown staining indicates the formation of a polymerization product when H₂O₂ reacts with DAB.....57

Figure 4. (A) Percentage of germinated conidia; (B) Germinated conidia with one appressorium; (C) Germinated conidia with multiple appressoria on apple leaves inoculated with *Colletotrichum fructicola* isolates58

Figure 5. (A) Box plots showing the variation in appressorial shape; (B) Appressorial type; (C) Appressorial melanization in apple leaves inoculated with *Colletotrichum fructicola* isolates.....58

Figure 6. Time course of electrolyte leakage (μS) in apple leaves at 24 (A) and 48 (B) hours after inoculation (HAI) with *Colletotrichum fructicola* isolates.....59

Figure 7. Time course of guaiacol peroxidase (A), catalase (B), ascorbate peroxidase (C), glutathione reductase (D), superoxide dismutase (E) activity and hydrogen peroxide content (F) in apple leaves inoculated with pathogenic *Colletotrichum fructicola* isolates causing ABR and GLS.....60

LISTA DE ABREVIATURAS

ABR	Podridão amarga em maçã (<i>Apple bitter rot</i>)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
ACT	Actina (<i>Actin</i>)
AFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (<i>Amplified fragment length polymorphism</i>)
APX	Ascorbato peroxidase (<i>Ascorbate peroxidase</i>)
BDA	Batata-dextrose-ágar
BSA	Albumina de soro bovino (<i>Bovine serum albumin</i>)
CAT	Catalase
CAL	Calmodulina (<i>Calmodulin</i>)
CHS	Quitina sintase (<i>Chitin synthase</i>)
DAB	Diaminobenzidina (<i>Diaminobenzidine</i>)
DNS	Ácido dinitrosalicílico (<i>Dinitrosalicylic acid</i>)
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis (2-nitrobenzóico)
EC	Número comissão internacional de enzimas (<i>Enzyme commission number</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoenzimático (<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>)
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GLS	Mancha foliar de glomerella (<i>Glomerella leaf spot</i>)
GPOD	Guaiacol peroxidase
GR	Glutationa redutase (<i>Glutathione reductase</i>)
GS	Glutamina sintetase (<i>Glutamine synthetase</i>)
GSH	Glutationa reduzida (<i>Reduced glutathione</i>)
GSSG	Glutationa oxidada (<i>Oxidized glutathione</i>)
HAI	Horas após inoculação (<i>Hours after inoculation</i>)
HIS	Histona (<i>Histone</i>)
HR	Reação de hipersensibilidade (<i>Hypersensitivity reaction</i>)
ISSR	Sequências internas simples repetidas (<i>Inter-Simple Sequence Repeat</i>)
ITS	Espaços internos transcritos (<i>Internal transcribed spacer</i>)
LAC	Laccase
MANE	Micoteca Anne Lore Schroeder
MFG	Mancha foliar de glomerella
ML	Máxima verossimilhança (<i>Maximum likelihood</i>)
MP	Máxima parcimônia (<i>Maximum parsimony</i>)
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo- phosphate

NBT	Nitroazul de tetrazólio (<i>Nitro blue tetrazolium</i>)
PA	Podridão amarga
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polimerase chain reaction</i>)
PG	Poligalacturonase (<i>Polygalacturonase</i>)
PL	Pectina liase (<i>Pectin lyase</i>)
PR	Proteínas relacionadas à patogênese (<i>Pathogenesis-related proteins</i>)
PVP	Polivinilpirrolidona (<i>Polyvinylpyrrolidone</i>)
RAPD	Amplificação aleatória de DNA polimórfico (<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismo no comprimento de fragmentos de Restrição (<i>Restriction fragment length polymorphism</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
SOD	Superóxido dismutase (<i>Superoxide dismutase</i>)
TBA	Ácido 2-tiobarbitúrico (<i>Thiobarbituric acid</i>)
TBE	Tris-borato-EDTA (<i>Tris-borate-EDTA</i>)
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic acid</i>)
TUB2	Beta tubulina (<i>Beta tubulin</i>)
U	Unidade internacional (<i>International units</i>)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral.....	26
2.2. Objetivos Específicos.....	26
3. REVISÃO DE LITERATURA	27
3.1. Cultura da macieira.....	27
3.2. Mancha foliar de glomerella (MFG).....	28
3.3. Podridão amarga (PA).....	31
3.4. O gênero <i>Colletotrichum</i>	33
3.5. Caracterização morfo cultural e molecular de <i>Colletotrichum</i> spp.....	35
3.6. Enzimas produzidas por <i>Colletotrichum</i> spp.....	37
3.7. Espécies reativas de oxigênio (ROS) nas respostas de defesa das plantas.....	39
4. CAPÍTULO 1 - NEW INSIGHTS INTO THE CHARACTERIZATION OF <i>Colletotrichum</i> SPECIES ASSOCIATED WITH APPLE DISEASES IN SOUTHERN BRAZIL AND URUGUAY	43
4.1. RESUMO.....	43
5. CAPÍTULO 2- FUNGAL EXTRACELLULAR ENZYMES AND MODULATION OF PLANT DEFENSE RESPONSES BY <i>Colletotrichum fructicola</i> IN APPLE LEAVES	45
5.1. ABSTRACT.....	45
5.2. INTRODUCTION.....	47
5.3. MATERIAL AND METHODS.....	50
5.3.1. <i>Colletotrichum</i> isolates	50
5.3.2. Determination of activity of fungal extracellular enzymes.....	50
5.3.3. Leaf infection assay	51
5.3.4. Microscopical analysis	52
5.3.5. Electrolyte leakage	53
5.3.6. Leaf enzyme assays and H ₂ O ₂ quantification	53
5.3.7. Experimental design and statistical analyses	55
5.4. RESULTS.....	55
5.4.1. Activity of fungal extracellular enzymes	55
5.4.2. Leaf infection.....	56

5.4.3. Microscopical analysis	57
5.4.4. Electrolyte leakage	58
5.4.5. Leaf enzyme assays and H ₂ O ₂ quantification.....	59
5.5. DISCUSSION.....	61
5.6. REFERENCES.....	66
6. CONCLUSÕES GERAIS	73
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma espécie de clima temperado de maior importância comercial, tanto no contexto internacional, quanto no nacional. A maior parte das maçãs produzidas na região do Mercosul destina-se ao consumo ‘*in natura*’ e os programas de melhoramento se orientam principalmente para a qualidade dos frutos e a produtividade das plantas (STADNIK et al., 2009).

Os fatores que afetam negativamente a produtividade da macieira são o baixo número de horas de frio, além da alta precipitação e umidade relativa do ar na primavera/verão que favorecem a ocorrência de doenças (PETRI, 2002). As perdas no cultivo dependem principalmente das condições de manejo e da presença de patógenos. O controle de doenças tem sido o principal fator de aumento nos custos de produção da maçã respondendo por cerca de 20% (KATSURAYAMA; BONETI, 2009).

O cultivo da macieira está sujeito ao ataque de doenças típicas de clima temperado e úmido como é o caso da sarna da macieira, causada por *Venturia inaequalis* (Cooke) G. Winter. Entretanto, devido à cultura estar localizada em regiões de clima subtropical, como é o caso da região sul do Brasil, é severamente atacada por doenças típicas de clima tropical, como por exemplo, a mancha foliar de *Glomerella* (MFG) e a podridão amarga (PA). *Colletotrichum gloeosporioides* (Penzig) Penzig & Sacc (teleomorfo: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld & Schrenk) e *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds são as principais espécies causadoras, porém recentemente novas espécies têm sido relatadas.

A MFG e a PA tornaram-se uma grande preocupação nos últimos anos, pois se desenvolvem principalmente durante verões quentes e chuvosos e a incidência vem aumentando a cada ciclo produtivo por todas as regiões produtoras de maçã no Brasil (BECKER et al., 2000b). As perdas de produção causadas pelo ataque da MFG são superiores a 75% (BECKER et al. 2000a), e da PA podem chegar a 50% em pré e pós-colheita (SUTTON et al. 1992).

Embora a MFG e a PA sejam causadas pelo mesmo patógeno e podem ocorrer simultaneamente nos pomares, até o momento não foi relatada a presença da MFG nas principais

regiões de cultivo de macieira no Uruguai. Dessa forma, um elemento a determinar é porque esta doença não está afetando as áreas produtoras no Uruguai.

Apesar da pequena distância geográfica, existe uma ampla área de isolamento entre as áreas de produção de maçã do Brasil e Uruguai. Contudo, outros fatores também podem estar relacionados, tais como, condições climáticas e características específicas de isolados de *Colletotrichum* presentes em cada zona de produção. Além disso, existe um grande intercâmbio de mudas de macieira do Brasil para o Uruguai, o que pode favorecer a disseminação de algumas doenças.

Isolados de *Colletotrichum* que causam a PA geralmente são incapazes de provocar a MFG, por outro lado, isolados causadores da MFG são capazes de causar somente pequenas lesões deprimidas nos frutos (VALDEBENITO-SANHUEZA, 1999). Porém, alguns estudos indicam que isolados de MFG também são capazes de ocasionar a PA (GONZALEZ et al., 2006). Dentro desse contexto, a caracterização e a identificação das espécies patogênicas de *Colletotrichum* são fundamentais para responder algumas dessas questões.

A identificação de espécies de *Colletotrichum* se baseava tradicionalmente nas diferenças morfológicas e culturais, mas utilizando apenas estes critérios não era possível a diferenciação, especialmente àquelas pertencentes a um mesmo complexo de espécies (CAI et al., 2009).

Atualmente estão disponíveis técnicas moleculares, que têm sido empregadas com sucesso na identificação de espécies dentro do gênero em diferentes patossistemas (FREEMAN et al., 2000). Entre as técnicas moleculares estão o AFLP, o RFLP (SREENIVASAPRASAD et al., 1992), o RAPD (WHITELAW-WECKERT et al., 2007), o teste ELISA (HUGHES et al., 1997). No entanto, a técnica de PCR com marcadores genéticos específicos e o sequenciamento multigênico vêm sendo utilizados com êxito em numerosos estudos para diferenciar espécies de *Colletotrichum* (HYDE et al., 2009).

Além da identificação e caracterização destas espécies, também há uma grande preocupação em compreender os mecanismos enzimáticos envolvidos durante o processo de infecção por isolados de *Colletotrichum*, e as reações de defesa da planta à MFG. Os prejuízos nas regiões produtoras atualmente

são grandes e até o momento não existem medidas totalmente eficazes para o controle da doença.

Um dos pontos chaves para compreender o processo de infecção do patógeno no hospedeiro é investigar como ocorrem as modificações bioquímicas e estruturais em ambos. A presença de patógenos nos tecidos da planta hospedeira implica na produção de uma série de enzimas extracelulares que facilitam a penetração e a colonização do fungo (PRUSKY et al., 2000). Essas enzimas promovem principalmente a degradação dos componentes da parede celular vegetal e também alterações no metabolismo celular do hospedeiro.

Os mecanismos de estresse oxidativo desempenham um papel crucial na regulação da resistência da planta em vários patossistemas. Dentre esses mecanismos, as espécies reativas de oxigênio (ROS) podem atuar na sinalização, ativando múltiplas respostas de defesa nas plantas ou podem afetar diretamente os patógenos. Esse sistema oxidativo é regulado por um arsenal complexo de enzimas, que pode determinar a resistência ou suscetibilidade das plantas (GILL; TUTEJA, 2010). Trabalhos recentes apresentam algumas evidências de que os mecanismos de estresse oxidativo podem desempenhar um papel importante na resistência da macieira à MFG (ARAÚJO; STADNIK, 2013).

Desta forma, este trabalho foi desenvolvido para esclarecer algumas questões acerca do patossistema *Malus domestica* x *Colletotrichum* spp., tais como, identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum* que afetam as folhas e os frutos de macieira no Sul do Brasil e Uruguai, e compreender alguns mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de resposta à infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificar e caracterizar isolados de *Colletotrichum* que afetam as folhas e os frutos de macieira no Sul do Brasil e Uruguai e investigar os principais mecanismos bioquímicos envolvidos no processo de infecção em folhas de macieira.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a caracterização morfológica e cultural dos isolados de *Colletotrichum* provenientes de folhas e frutos de macieira do sul do Brasil e Uruguai;
- ✓ Identificar molecularmente isolados de *Colletotrichum* através de sequências multigênicas;
- ✓ Quantificar a produção de enzimas extracelulares produzidas por isolados de *Colletotrichum* provenientes de MFG e PA;
- ✓ Determinar a atividade das enzimas envolvidas no estresse oxidativo, os níveis de peróxido de hidrogênio e a perda de eletrólitos em folhas de macieira infectadas com isolados de *Colletotrichum* de MFG e PA;
- ✓ Avaliar o desenvolvimento de estruturas de infecção em tecidos foliares de macieira inoculados com isolados de *Colletotrichum* de MFG e PA.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. CULTURA DA MACIEIRA

A macieira (*Malus domestica* Borkh.) é uma das espécies frutícolas de clima temperado mais cultivada no mundo (VELASCO et al., 2010). Pertence a família *Rosaceae* subfamília *Pomoideae* e possui plantas com folhas alternadas, simples, caducas e o fruto é do tipo pomo (EPAGRI, 2002).

O centro de origem da macieira cultivada encontra-se nas regiões da Ásia Menor, Cáucaso, Ásia Central, Índia e Paquistão, sendo que as cultivares existentes atualmente possuem como ancestral selvagem materiais provenientes da Ásia e Europa Ocidental (CORNILLE et al., 2012).

A macieira é cultivada em todos os continentes, principalmente em países do hemisfério norte, sendo a China o maior produtor mundial, seguido pelos Estados Unidos e vários produtores menores. Na América do Sul, os principais países produtores são Chile, Argentina, Brasil, Peru e Uruguai (FAOSTAT, 2014).

No Brasil, a espécie passou a ser cultivada a partir do século XX inicialmente no estado de SP, e em poucos anos transformou-se em um produto de intensa comercialização em todo o país, expandindo-se também para regiões não tradicionais ao cultivo. Em SC, a produção foi impulsionada a partir da década de 70, com a implantação de diversas empresas atraídas por incentivos fiscais, e estabelecimento de um programa de melhoramento genético lançando diversas novas cultivares (PETRI et al., 2011). Consequentemente, o país passou de importador para autossuficiente na produção do fruto e ainda exporta 12% do total colhido.

Atualmente, a produção de maçã possui grande importância sócio-econômica no Brasil, sendo que a produção na última safra alcançou 1,2 milhão de toneladas (FAOSTAT, 2014). Os principais produtores concentram-se 96% nos três estados do sul, sendo que SC detém 55 % da produção, RS 41% e PR com apenas 4% (IBGE-LSPA, 2013). As principais variedades cultivadas são a ‘Gala’ (58%), sendo responsável por 95% da exportação e a ‘Fuji’ (37%), além disso, grande parte dos novos plantios estão sendo realizados com cultivares derivadas de

‘Gala’ ou ‘Fuji’, tais como a ‘Royal Gala’, ‘Imperial Gala’ e ‘Fuji Suprema’.

No Uruguai, a produção concentra-se também na região sul do país, nos departamentos de Montevideu, Canelones e San José. A produção na safra 2012/2013 foi de 49 mil toneladas. As principais variedades cultivadas são as derivadas da ‘Red Delicious’ (‘Red Chief’, ‘Top Red’, ‘Early Red One’), ‘Granny Smith’, ‘Cripps Pink’ e ‘Royal Gala’ (MGAP-DIEA, 2013).

A época de colheita de maçã ocorre nos meses de janeiro a maio, dependendo da cultivar e da região produtora. A cultura é muito dependente das condições climáticas, e uma boa safra depende da ocorrência de um elevado número de horas de frio, pouca chuva no período de florescimento e de altos índices pluviométricos na época da brotação (IUCHI, 2002). A incidência de chuvas de granizo e o manejo de doenças no campo e em pós-colheita são os principais problemas que limitam a produção e aumentam os custos (EPAGRI, 2002).

As principais doenças que afetam os cultivos são a sarna da macieira causada pelo patógeno *Venturia inaequalis*, a mancha foliar de glomerella (MFG) e a podridão amarga (PA) causadas por *Colletotrichum* spp., e outras de importância secundária como o cancro papel das macieiras e a podridão branca causada por *Botryosphaeria dothidea*, e o cancro dos ramos e a podridão olho de boi causados por *Cryptosporiopsis perennans*.

3.2. MANCHA FOLIAR DE GLOMERELLA (MFG)

A mancha foliar de glomerella (MFG) é uma doença que tornou-se uma das grandes preocupações para os produtores de maçã no Brasil (STADNIK et al., 2009) e no mundo (GONZALEZ et al., 2006; WANG et al., 2012).

No Brasil, a MFG foi constatada pela primeira vez no município de Porto Amazonas-PR na década de 80 (LEITE et al., 1988), e logo disseminou-se pela região de Fraiburgo-SC (88/89), Vacaria e Caxias do Sul-RS (92/93), e em 1997 se estabeleceu em São Joaquim-SC após uma longa temporada de chuvas e elevadas temperaturas ocasionadas pelo fenômeno climático El Niño (KATSURAYAMA; BONETI, 2009).

Na América do Sul, a MFG está presente somente no Brasil. No hemisfério norte, foi reportada pela primeira vez nos EUA na década de 70 no estado da Geórgia, ocasionando mancha

foliar em macieiras da cv. Golden Delicious (TAYLOR, 1971a). Ao longo dos anos, a doença progrediu do sul para o norte do país e atualmente encontra-se presente nos estados do Tennessee, Carolina do Norte (GONZALEZ; SUTTON, 1999), Nova York (ROSENBERGER, 2012) e Michigan (SHANE, 2012). Além disso, foi reportada recentemente em sete províncias no sudoeste da China (WANG et al., 2015).

Os primeiros sintomas da doença surgem principalmente nas folhas mais jovens e na parte interna da planta. Inicialmente surgem manchas irregulares de cor marrom-avermelhadas na face adaxial das folhas que são visíveis aproximadamente 2 dias após a infecção. Ao longo do tempo, as manchas evoluem tornando-se marrom-acinzentadas (1-10 mm), necrosam e após 7-10 dias as folhas eventualmente amarelecem e caem (Figura 1). Em frutos, a MFG ocasiona pequenas lesões deprimidas de cor marrom-claro (1-3 mm), que geralmente não aumentam e não evoluem para podridão (SUTTON; VALDEBENITO-SANHUEZA, 1998).

A MFG manifesta-se durante o verão, e ocasiona um desfolhamento severo em plantas de macieira (acima de 75%) comprometendo a produção nos anos seguintes. A doença é favorecida pelas condições de alta umidade relativa e temperaturas mais elevadas para a cultura (23-28°C). A disseminação dos conídios se dá pela água da chuva ou forte orvalho devido à dissolução da mucilagem que contém a massa de conídios (CRUSIUS et al., 2001).

Duas espécies de *Colletotrichum* estão associadas à MFG, *Colletotrichum gloeosporioides* (fase teleomórfica: *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spaulding & Scherenk) e *Colletotrichum acutatum* (GIARETTA et al. 2010), sendo que a primeira é a mais frequente e apresenta um maior potencial patogênico (GONZALEZ et al., 2006). Cultivares de macieira descendentes da ‘Golden Delicious’ como a ‘Gala’ são altamente suscetíveis à MFG, enquanto que as descendentes do grupo ‘Delicious’ como a ‘Fuji’, apresentam resistência completa à doença, e tem caráter monogênico recessivo (STADNIK, 2009).

A sobrevivência tem sido associada à presença do fungo sobre gemas, ramos dormentes e cancrios presentes na planta (CRUSIUS et al. 2001; BØRVE; STENSVAND, 2007; HAMADA et al., 2013).

Não existem medidas totalmente eficazes para o controle da MFG. As práticas utilizadas são basicamente aquelas que

visam reduzir qualquer fonte de inóculo para o ano seguinte. Folhas e frutos em decomposição constituem uma importante fonte de inóculo inicial (HAMADA et al., 2013). Assim, a eliminação de restos culturais como folhas e frutos mumificados, é uma medida de controle muito utilizada pelos pequenos produtores.



Figura 1. Sintomas típicos da mancha foliar de *glomerella* (MFG) em folhas da cultivar Gala. (A) Sintomas típicos que ocorrem 4-5 dias após a infecção; (B) Manchas necróticas associadas com amarelecimento das folhas aproximadamente 10 dias após a infecção; (C) Sintomas da MFG em diferentes estágios de desenvolvimento.

A pulverização com fungicidas do grupo dos ditiocarbamatos e estrobilurinas são os métodos mais utilizados (KATSURAYAMA; BONETI, 2012), porém, não são muito eficientes sob alta pressão de inóculo. As aplicações de fungicidas são realizadas em intervalos de 10 dias e repetidas quando a chuva acumulada atinge 30 mm, o que resulta em um elevado número de pulverizações (BECKER et al., 2004b).

O uso de cultivares resistentes é um método de controle eficiente, econômico e que oferece menor risco à saúde do produtor e do consumidor (FURLAN et al., 2010). No entanto, muitos genótipos resistentes à MFG não são apreciados pelos consumidores.

3.3. PODRIDÃO AMARGA (PA)

A podridão amarga é uma doença que afeta a cultura da macieira há séculos e encontra-se disseminada em quase todas as regiões produtoras no mundo (SHI et al., 1996; GONZALEZ; SUTTON, 2004).

A PA foi descrita pela primeira vez na Inglaterra em 1856 e uma década depois nos EUA (TAYLOR, 1971b). No Brasil, a doença tornou-se importante após a década de 70 quando ocorreu um aumento da produção no país (DENARDI et al. 2003).

O principal sintoma da doença são lesões circulares, de cor castanho-claro e aspecto deprimido (Figura 2). Na polpa, a lesão desenvolve-se em forma cônica aprofundando-se em formato de “V”.



Figura 2. Sintomas típicos de podridão amarga (PA) em frutos da cv. Cripps Pink onde é possível observar lesão circular de cor castanho-claro de aspecto deprimido, e os acérvulos dispostos em anéis concêntricos.

Podem ocorrer várias lesões por fruto e quando as lesões alcançam um tamanho de 1,5 a 2,0 cm é possível observar

acérvulos dispostos em anéis concêntricos (MONDINO et al., 2009). No caso das lesões serem causados pela fase teleomórfica *Glomerella cingulata*, peritécios podem ser observados no centro das lesões (SHI et al. 1996).

A frequência da doença depende muito dos fatores climáticos e ocorre principalmente durante períodos quentes e com alta umidade relativa. A temperatura ótima para o desenvolvimento ocorre entre 22 e 26°C (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). A disseminação se dá pelos conídios e ascósporos que são liberados pela água da chuva ou trazidos pelo vento. Insetos e pássaros também estão envolvidos na dispersão.

Em relação à PA, foram reportadas várias espécies causadoras, tais como: *C. gloeosporioides*, *C. acutatum*, *Colletotrichum fioriniae* (Marcelino & Gouli) R.G. Shivas & Y.P. Tan (SHIVAS; TAN, 2009), *Colletotrichum clavatum* Agosteo, Faedda & Cacciola (KOU et al., 2014), *Colletotrichum godetiae* Neerg (BARONCELLI et al., 2014) e *Colletotrichum fragariae* A.N. Brooks. no Uruguai (ALANIZ et al., 2012).

Diferentemente da MFG, todas as variedades de maçã são sensíveis à PA, principalmente a ‘Gala’ e a ‘Golden Delicious’ (DENARDI et al. 2003). A alta incidência de PA pode resultar em intensas perdas na colheita (GONZALEZ; SUTTON, 2004) e na pós-colheita através da manifestação de infecções latentes (MONDINO et al., 2009).

O controle cultural através da remoção dos restos vegetais contaminados é muito utilizado, pois os isolados causadores da PA podem sobreviver saprofiticamente nas gemas, nos cancrios e em frutos mumificados (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002).

Aplicações preventivas com fungicidas protetores a partir da queda das pétalas até a colheita é o tipo de controle químico mais utilizado (BONETI; KATSURAYAMA, 2012). Alguns produtos recomendados são: folpet, captan, dithianon, chlorothalonil e benzimidazóis (VALDEBENITO-SANHUEZA et al., 2002). No entanto, alguns não são eficazes dependendo da sensibilidade dos isolados a alguns fungicidas principalmente do grupo dos benzimidazóis (HAMADA et al., 2009).

3.4. O GÊNERO *Colletotrichum*

Espécies do gênero *Colletotrichum* são fitopatógenos de extrema importância, porque causam danos econômicos significativos em várias culturas de regiões tropicais, subtropicais e temperadas (DEAN et al., 2012), além de plantas ornamentais (BAILEY; JEGER, 1992).

Pertencem ao 8º grupo de fitopatógenos mais importantes no mundo (DEAN et al., 2012), e englobam os fungos imperfeitos pertencentes à ordem *Melanconiales* da classe *Coelomycetes*, os quais apresentam uma associação teleomórfica com estirpes homotálicas (auto-férteis) ou heterotálicas (auto-estéreis) dos ascomicetos do gênero *Glomerella* (ZHANG et al., 2006).

O gênero *Colletotrichum* apresenta acérvulos em forma de disco achatado, subepidérmico, conidióforos simples e alongados, conídios hialinos unicelulares que podem ser cilíndricos, fusiformes ou curvados (BAILEY; JEGER, 1992; THAUNG, 2008). Os conídios nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água, que provavelmente protege-os da dessecação e aumenta a eficiência da germinação e penetração no tecido hospedeiro (CANNON et al., 2012).

Os sintomas típicos associados às doenças causadas por espécies de *Colletotrichum* são conhecidas como antracnoses, sendo caracterizadas por lesões necróticas circulares de aspecto deprimido (FREEMAN et al. 1998), no entanto, são capazes de ocasionar diversos sintomas, como manchas foliares, cancrios, desfolhamento, queda de flores, necrose em raízes, entre outros (WHARTON; DIÉGUEZ-URIBEONDO, 2004).

Várias abordagens têm sido utilizadas para estudar os mecanismos envolvidos na diferenciação de estruturas infectivas de *Colletotrichum* e interações planta-patógeno. As fases iniciais do desenvolvimento dessas estruturas possuem muitas semelhanças entre si (WHARTON; DIÉGUES-URIBEONDO, 2004; PERES et al., 2005).

Logo após a deposição na superfície das folhas, através de sinais físicos e químicos os conídios iniciam o processo de germinação (DEISING et al., 2000). Cerca de três horas após a germinação, inicia o processo de alongação dos tubos germinativos e a diferenciação em apressórios sésseis ou

pedicelados (ARAÚJO et al., 2014). Com o apressório maduro, ocorre a melanização do apressório e um acúmulo de glicerol, tornando-os mais resistentes, o que auxilia na forte pressão de turgor exercida durante o processo de penetração na cutícula (DEISING et al.; 2000).

Após a penetração, ocorre a colonização dos tecidos vegetais pelo fungo, e no caso da MFG, resulta em lesões necróticas na face abaxial das folhas. Com o avanço da doença, essas lesões posteriormente irão exibir estruturas reprodutivas denominadas acérvulos (WHARTON; DIÉGUES-URIBEONDO, 2004) (Figura 3).

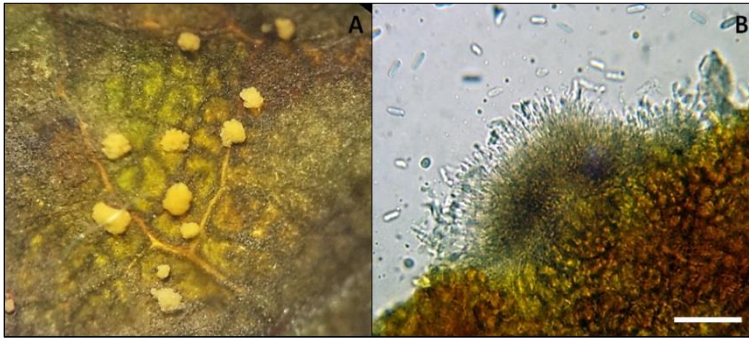


Figura 3. (A) Acérvulos envolvidos por uma matriz gelatinosa na superfície de uma folha de macieira infectada com um isolado causador da mancha foliar de glomerella (MFG); (B) Acérvulo visto em corte transversal (Barra:50µm).

O gênero *Colletotrichum* utiliza duas estratégias para a colonização de seus hospedeiros: a colonização intracelular hemibiotrófica e subcuticular intramural necrotrófica. Na intracelular hemibiotrófica o patógeno desenvolve-se biotroficamente, expandindo suas hifas para o interior celular formando uma vesícula de infecção. Após a colonização, uma hifa primária intracelular dá origem a uma hifa secundária necrotrófica (Figura 4A). Já na subcuticular intramural necrotrófica o patógeno cresce no interior da parede anticlinal e periclinal das células epidérmicas (Figura 4B) (PERFECT et al., 1999).

Algumas espécies de *Colletotrichum* podem utilizar as duas estratégias de infecção (BAILEY et al., 1992; O'CONNEL

et al. 2000). Até o momento não se conhece qual estratégia é utilizada pelos isolados de *Colletotrichum* que afetam a macieira. Araújo et al. (2014) sugerem que os isolados utilizam preferencialmente a estratégia de colonização subcuticular intramural necrotrófica.

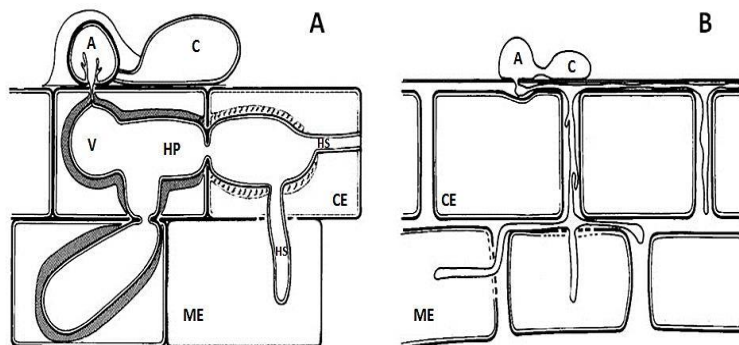


Figura 4. Estratégias de infecção utilizadas pelas espécies do gênero *Colletotrichum*. (A) Intracelular hemibiotrófica; (B) Subcuticular intramural necrotrófica. C=Conídio, A=Apressório, V=Vesícula, HP=Hifa primária, HS=Hifa secundária, CE=célula epidérmica, ME=mesófilo. Adaptado de Perfect et al. (1999).

3.5. CARACTERIZAÇÃO MORFOCULTURAL E MOLECULAR DE *Colletotrichum* spp.

A caracterização de espécies de *Colletotrichum* tem sido uma das grandes preocupações de inúmeros taxonomistas (SHENOY et al., 2007). A identificação dentro do gênero apresenta consideráveis dificuldades, pois a espécie apresenta características morfológicas muito variáveis e as fases teleomórficas raramente são formadas (HYDE et al., 2009).

Para diferenciar isolados de *Colletotrichum*, métodos tradicionais tais como, cor da colônia, forma e tamanho dos conídios, taxa de crescimento, presença ou ausência de setas, sensibilidade ao fungicida benomil e capacidade de hidrolisar caseína são muito utilizados. No entanto, essas características atualmente são consideradas insatisfatórias para a correta identificação dos isolados (FREEMAN et al., 1998).

A sensibilidade ao fungicida benomil (grupo benzimidazóis) é utilizada em vários trabalhos para diferenciação de isolados de *C. gloeosporioides* e *C. acutatum* de diferentes hospedeiros, visto que, muitos apresentam diferentes níveis de sensibilidade. Isolados de *C. gloeosporioides* são altamente sensíveis, mas podem apresentar resistência moderada, enquanto os de *C. acutatum* apresentam total resistência ao fungicida (VALERO et al., 2010).

As dificuldades encontradas em relação à identificação de espécies de *Colletotrichum* estão relacionadas à grande diversidade fenotípica dos isolados (THAUNG, 2008), influência de fatores ambientais na estabilidade dos caracteres morfoloculturais e a falta de padronização das condições culturais empregadas nos diferentes estudos (SUTTON, 1992; CAI et al., 2009).

De acordo com Weir et al. (2012), várias espécies classificadas como *C. gloeosporioides* por Von Arx (1957) são na realidade espécies pertencentes a outros complexos de espécies. Nesse contexto, aliado à caracterização morfológica e cultural, a identificação molecular tem sido o método mais utilizado para os estudos taxonômicos e para a determinação das relações filogenéticas de *Colletotrichum* spp. (DAMM et al., 2012).

Estudos moleculares para a classe dos *Coelomycetes* iniciaram por volta de 1990 com DNA ribossômico, disponibilizando marcadores moleculares para análise rápida e detalhada de polimorfismos com sequências de DNA ou RNA (THAUNG, 2008; WEIR et al., 2012). Adicionalmente, análises de sequências amplificadas da região ITS (WHITE et al., 1990), o ISSR (RATANACHERDCHAI et al., 2010), o RAPD (TALAMINI et al., 2006), o RFLP (BERNSTEIN et al. 1995), os microssatélites (UREÑA-PADILLA et al., 2002) e as sequências MAT1-2 (DU et al., 2005) foram desenvolvidos posteriormente para os estudos de variabilidade genética.

A identificação molecular de *Colletotrichum* geralmente se baseia no sequenciamento da região dos espaços internos transcritos do DNA ribossômico (ITS-rDNA) (SCHOCH et al., 2012). As sequências deste marcador apresentam uma variabilidade relativamente elevada e de fácil amplificação (BEGEROW et al., 2010), porém a utilização do ITS tem gerado muitas dúvidas a respeito da precisão dos resultados. O marcador pode gerar informações contraditórias às verdadeiras

características morfológicas dos isolados provenientes de um mesmo hospedeiro, além de ser ineficiente para diferenciar espécies dentro um mesmo complexo (DAMM et al., 2012).

Dessa forma, para identificar e resolver as relações filogenéticas dentro das espécies de *Colletotrichum*, recomenda-se a realização de análises filogenéticas utilizando além do ITS, outros marcadores baseados nas sequências parciais das regiões codificantes para a actina (ACT), calmodulina (CAL), quitina sintase (CHS-1), gliceradeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), glutamina sintetase (GS), histona 3 (HIS3), manganês superóxido dismutase (SOD2) e β -tubulina 2 (TUB2) (WEIR et al., 2012, DAMM et al., 2012). Atualmente, a técnica de análise de sequências multilocus é considerada uma ferramenta essencial na identificação de espécies de *Colletotrichum* (CANNON et al., 2012).

3.6. ENZIMAS PRODUZIDAS POR *Colletotrichum* spp.

Muitos estudos indicam que as enzimas produzidas pelos fungos são responsáveis pela degradação da parede celular vegetal, e podem determinar a especificidade e a resistência de um patógeno.

As enzimas envolvidas em doenças de plantas têm como substratos principais os componentes da parede celular vegetal e os constituintes do seu protoplasto (RESENDE; MACHADO, 2000). A composição e a estrutura da parede celular das plantas diferem entre espécies, mas basicamente todas são compostas principalmente de microfibrilas de celulose, hemicelulose, pectina, lignina e proteínas estruturais (RAMOS et al., 2010; KUBICEK et al., 2014).

Espécies de *Colletotrichum* produzem uma ampla gama de enzimas capazes de degradar polissacarídeos e dessa forma podem alterar ou degradar os carboidratos presentes na parede celular (BAILEY; JEGGER, 1992), todavia informações acerca das enzimas produzidas pelos fungos deste gênero são limitadas. Estudos recentes com *C. higginsianum* e *C. graminicola*, demonstram que estes patógenos são equipados com genes codificantes para CAZymes (carbohydrate-active enzymes) que potencialmente auxiliam na degradação da parede celular da planta e modificam a parede celular dos fungos (O'CONNEL et al., 2012).

As enzimas que degradam as paredes das células vegetais e outras barreiras físicas são consideradas essenciais para patogenicidade. No entanto, algumas são consideradas de difícil detecção, pois são frequentemente codificadas em famílias multigênicas, são muito influenciadas pelo pH, e somente são estudadas com a utilização de mutantes e técnicas de imunofluorescência (IDNURM; HOWLETT, 2001).

Dentre as enzimas mais estudadas, podem ser citadas as cutinases, as pectinases e as ligninases. As cutinases são esterases que quebram as ligações éster entre moléculas de cutina e liberam monômeros ou oligômeros derivados de ácidos graxos (MENDGEN; DEISING, 1993). Apesar da importância, a produção destas enzimas *in vitro* é muito baixa, e não demonstra a sua verdadeira função na patogenicidade dos isolados e na infecção de plantas. Contudo, trabalhos conduzidos com inibidores da cutinase em *C. gloeosporioides* em mamão, demonstram que a desativação destas enzimas evita a penetração do fungo (RESENDE; MACHADO, 2000). Dessa forma, algumas espécies de *Colletotrichum* certamente requerem atividade da cutinase para penetração, enquanto que outras conseguem superar a barreira da cutícula de outras formas (BAILEY; JEGER, 1992).

As primeiras enzimas produzidas após a infecção do fungo em uma célula vegetal, são as que degradam os polímeros da pectina, a poligalacturonase (PG), seguida pela pectina liase (PL) (IDNURM; HOWLETT, 2001).

As PGs tem um papel crucial na patogenicidade do fungo por meio da despolimerização da homogalacturona, o principal componente da parede celular. Esta enzima quebra as ligações glicosídicas α -1,4 formadas entre o ácido D-galacturônico e os resíduos da L-ramnose (KUBICEK et al., 2014). O *C. gloeosporioides* produz diferentes formas da enzima PG e tais diferenças podem influenciar na patogenicidade (PRUSKY et al., 2001). De acordo com Bailey et al. (1992), PGs com alto ponto isoeletrico influenciam na patogenicidade. Além disso, as PGs também podem atuar elicitando respostas de defesa na planta, tais como, acúmulo de fitoalexinas, síntese de lignina e produção de β -1,3 glucanase (CERVONE et al., 1996).

A enzima PL é considerada tóxica para a célula vegetal e está muito envolvida com a fase necrotrófica de *Colletotrichum* spp. Esta enzima quebra as cadeias de polissacarídeos do ácido

urônico através do mecanismo de β -eliminação (KUBICEK et al., 2014). A PL é detectada principalmente em tecidos vegetais no início do processo de infecção, quando as células já estão em fase de senescência, mas ainda não produziram sintomas visíveis (WIJESUNDERA et al., 1989). Em estudos com *Colletotrichum gloeosporioides* f.sp. malvae, a PL foi detectada no final da fase biotrófica e apresentou um aumento durante a fase necrotrófica (SHIH et al. 1999). Além disso, a degradação da pectina pela PL é uma das principais características das doenças que ocasionam podridão em frutos (COLLMER; KEEN, 1986).

A Laccase (LAC) é uma enzima extracelular pertencente ao grupo das p-diphenol oxidases, produzida por diversos patógenos principalmente fungos (GUETSKY et al., 2005). A LAC está envolvida na degradação da lignina (LEVIN et al., 2007), melanização de apressórios em *C. orbiculare* (LIN et al., 2012) e no aumento da virulência em *C. gloeosporioides* (GUETSKY et al., 2005).

Além disso, esta enzima desempenha um papel muito importante na proteção do patógeno contra os mecanismos de defesa da planta que incluem a desintoxicação de fitoalexinas e compostos fenólicos, e proteção contra as respostas oxidativas (BALDRIAN, 2006). De acordo com Chi et al. (2009), mutantes de *Magnaporthe oryzae* com atividade reduzida de LAC tiveram uma redução significativa nas respostas de defesa em plantas de arroz.

3.7. ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) NAS RESPOSTAS DE DEFESA DAS PLANTAS

As espécies reativas de oxigênio (ROS) estão envolvidas no processo da remoção sequencial de elétrons do oxigênio molecular (${}_{1}O_{2}$). Através de uma série de reações, o oxigênio molecular desencadeia a formação de O_{2}^{-} , $H_{2}O_{2}$, OH , HO_{2} , e outros produtos que são altamente reativos e tóxicos para as células (GILL; TUTTEJA, 2010).

As ROS controlam diferentes processos em plantas relacionados a estresses bióticos e abióticos. Essas moléculas se formam naturalmente no interior celular, nos cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos, como produtos secundários oriundos da fotossíntese e respiração (HELLER; TUDZINSKI,

2011). No entanto, por serem moléculas tóxicas são capazes de causar injúria celular (MITTLER et al., 2004).

Vários sistemas enzimáticos e não enzimáticos estão envolvidos na produção de ROS. Oxalato oxidases, peroxidases, lipoxigenases e amina oxidases são propostos para a geração de ROS no apoplasto (BOLWEL; WOJTASZEK, 1997). No entanto, o sistema enzimático mais importante é o chamado complexo dependente de NADPH oxidase (Nox) (SHETTY et al., 2008).

Diversos fatores ambientais, como o estresse e o reconhecimento de um patógeno pela planta, podem ocasionar um aumento nos níveis de ROS que podem ser prejudiciais à planta ou também desencadear respostas de defesa (TORRES; DANGL, 2005). Essas moléculas podem agir causando danos diretos aos patógenos através de seu efeito tóxico, inibindo seu desenvolvimento ou agindo como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa.

No início do processo infeccioso, as ROS podem acumular-se rapidamente em um fenômeno conhecido como explosão oxidativa. A explosão oxidativa corresponde a uma resposta rápida e transiente à formação de uma grande quantidade de O_2^- e H_2O_2 (TORRES; DANGL, 2005).

A formação de ROS pode diferir entre as interações compatíveis e incompatíveis entre patógenos. Patógenos avirulentos induzem a formação de ROS em duas fases. A fase I é considerada uma resposta rápida de baixa amplitude, que dura poucos minutos; já na fase II ocorre uma explosão mais forte e prolongada que está diretamente relacionada às respostas de defesa e a reação de hipersensibilidade (HR). Em patógenos virulentos, apenas a fase I é observada, o que sugere que há uma supressão dessa segunda fase. No entanto, os mecanismos que comandam essa supressão são desconhecidos até o momento (HELLER; TUDZINSKI, 2011).

A produção de ROS também pode variar de acordo com o estilo de vida do patógeno. Em patógenos biotróficos as ROS podem suprimir as respostas do hospedeiro durante o processo de infecção, por outro lado, os necrotróficos são beneficiados pela produção de ROS, e até mesmo podem estimular o hospedeiro a produzir uma maior quantidade (SHETTY et al., 2008). Em hemibiotróficos, o papel das ROS ainda não está bem esclarecido, mas alguns estudos indicam que eles podem se beneficiar do acúmulo em algum estágio, ou seja, no biotrófico ou necrotrófico.

Os efeitos primários ocasionados pelo aumento da ROS em plantas consistem no fortalecimento da parede celular e na indução da atividade microbiana, mas também podem atuar de maneira secundária como moléculas sinalizadoras na indução de resistência, tais como, síntese de proteínas relacionadas à patogênese (PR), fitolaexinas e morte celular programada (TORRES; DANGL, 2005).

Uma das respostas mais prejudiciais à membrana celular ocasionada pelo aumento das ROS, diz respeito à peroxidação dos lipídios. Os efeitos da peroxidação ocasionam diminuição da permeabilidade e danos às proteínas de membrana, além da inativação de receptores, enzimas e canais de íons (ESFANDIARI et al., 2010). Além disso, quando a concentração de ROS atinge certos limites, a morte celular programada é ativada, que tem como consequência um aumento da perda de eletrólitos.

Para evitar os danos celulares ocasionados pelo acúmulo das ROS, as plantas desenvolveram elaborados mecanismos para gerenciá-los em níveis sustentáveis. Algumas enzimas, conhecidas como “*scavengers*” desempenham um papel muito importante na redução dos níveis de ROS e ajudam a evitar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo. São elas, a guaiacol peroxidase (GPOD), catalase (CAT), ascorbato peroxidase (APX), glutatona redutase (GR) e a superóxido dismutase (SOD) (GILL; TUTEJA, 2010).

As PODs geralmente aumentam sua atividade após o ataque de um patógeno, e ao mesmo tempo podem atuar na eliminação das ROS (MITTLER et al., 2011). A GPOD está envolvida em diversas reações, tais como, ligações de polissacarídeos, oxidação do ácido indol-3-acético, ligações de monômeros, lignificação, oxidação de fenóis, defesa de patógenos e alongação celular (LAMB; DIXON, 1997).

A CAT converte H_2O_2 para H_2O e O_2 e desempenha um papel significativo na redução dos níveis elevados de H_2O_2 nos peroxissomos (BAKER; ORLANDI, 1995). A CAT tem uma das maiores taxas de rotatividade comparada às outras enzimas. Uma molécula de CAT pode converter aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto (GILL; TUTEJA, 2010).

A APX e a GR são as principais enzimas responsáveis pela remoção das ROS nos cloroplastos. Ambas são importantes

no ciclo ascorbato-glutationa e estão diretamente envolvidas na desintoxicação do H_2O_2 , sustentando o status reduzido do ascorbato e da glutatona. O estado reduzido do ascorbato produz glutatona oxidada (GSSG), a qual é reduzida pela glutatona redutase (GR) utilizando NADPH como doador de elétrons (LAMB; DIXON, 1997).

A SOD catalisa a dismutação de O_2^- e HO_2^- em H_2O_2 e possuem como cofatores alguns metais, como Cu/Zn, Mn e Fe. As SODs são consideradas importantes agentes antioxidantes, porém, em elevadas concentrações nas células animais, bacterianas e vegetais podem induzir disfunções e morte celular (BAKER; ORLANDI, 1995).

Estas enzimas são cruciais para a diminuição do impacto do estresse oxidativo e quando ocorre uma alteração no balanço de algumas delas, mecanismos compensatórios são imediatamente ativados (MITLLER et al. 2011).

4. CAPÍTULO 1 - NEW INSIGHTS INTO THE CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum* SPECIES ASSOCIATED WITH APPLE DISEASES IN SOUTHERN BRAZIL AND URUGUAY¹

Caracterização de espécies de Colletotrichum associadas à doenças da macieira no sul do Brasil e Uruguai

Aline Cristina VELHO; Sandra ALANIZ; Leticia CASANOVA; Pedro MONDINO; Marciel J. STADNIK

4.1. RESUMO

O gênero *Colletotrichum* é considerado um dos mais importantes patógenos de plantas que afetam uma ampla gama de hospedeiros e causam doenças economicamente importantes. Em macieira, está associado a duas doenças distintas, a Podridão amarga (PA) e a Mancha foliar de Glomerella (MFG) que diferem nas suas características epidemiológicas.

Considerando que ambas ocorrem frequentemente no Brasil, somente a PA foi reportada no Uruguai até o momento. Estudos recentes envolvendo a sistemática das espécies de *Colletotrichum* indicam que o gênero representa um grande complexo de espécies. Técnicas moleculares, combinadas com caracterização morfocultural e testes de patogenicidade demonstraram ser eficazes na identificação de espécies de *Colletotrichum*. Assim, o objetivo do trabalho foi identificar e comparar as características morfoculturais e patogênicas dos isolados de *Colletotrichum* que afetam pomares de macieira no sul do Brasil e Uruguai.

Para o isolamento, frutos e folhas de macieira com sintomas típicos de PA e MFG, respectivamente, foram coletados em diferentes pomares no sul do Brasil e Uruguai. Após o isolamento foram realizados cultivos monospóricos para posterior identificação molecular, caracterização morfocultural e testes de patogenicidade.

A identificação molecular e a análise filogenética foi realizada utilizando três marcadores, a região dos espaços internos transcritos (ITS-rDNA), o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a β -tubulina (TUB2). Para a

¹Artigo publicado no periódico Fungal Biology (The British Mycological Society. Elsevier Ltd. All rights reserved).

Versão original disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.009>

caracterização morfofocultural, os isolados foram avaliados quanto a cor da colônia, taxa de crescimento em diferentes temperaturas, sensibilidade ao fungicida benomil e tamanho e formato de conídios e apressórios. A patogenicidade de todos os isolados foi testada em frutos e folhas de macieira suscetíveis.

Um total de trinta e nove isolados de *Colletotrichum* foram obtidos a partir de frutos e folhas infectadas. A amplificação e o sequenciamento utilizando os três marcadores permitiu a identificação de três espécies causadoras de PA e MFG no Brasil, o *Colletotrichum fructicola* afetando folhas e frutos, o *Colletotrichum karstii* identificado pela primeira vez causando MFG, e o *Colletotrichum nymphaeae* causando PA. Três espécies causadoras de PA também foram identificadas no Uruguai, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum theobromicola* e *Colletotrichum melonis*.

Seis grupos de cor de colônia foram identificados, sendo o grupo 1 (micélio branco rosado com reverso rosado) e o grupo 2 (micélio branco cinzento com reverso rosado) os mais frequentes. O maior crescimento micelial foi observado na temperatura de 25 °C para todas as espécies. Isolados de *C. fructicola* e *C. theobromicola* foram sensíveis ao benomil, enquanto que *C. karstii*, *C. nymphaeae* e *C. melonis* foram resistentes. Os conídios de *C. fructicola* e *C. karstii* foram predominantemente de formato cilíndrico, de *C. nymphaeae* e *C. melonis* fusiformes e *C. theobromicola* obclavos. Todos os isolados exibiram apressórios com formato oval.

Os isolados brasileiros causaram PA em frutos com ferimentos, mas somente 5 em frutos sem ferimentos. Os isolados uruguaios produziram sintomas em frutos com e sem ferimentos. Todos os isolados brasileiros provenientes de MFG e 12 de PA foram capazes de causar sintomas de MFG, enquanto que somente um isolado uruguaio de PA foi capaz de causar mancha foliar em plântulas de macieira.

Este estudo gerou novos conhecimentos acerca das espécies de *Colletotrichum* que afetam a macieira em ambos os países e discute seu potencial patogênico.

Palavras chave: *Colletotrichum* spp, Filogenia, Mancha foliar de Glomerella, Morfologia, Patogenicidade, Podridão amarga.

¹Artigo publicado no periódico Fungal Biology (The British Mycological Society. Elsevier Ltd. All rights reserved).

Versão original disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.009>

5. CAPÍTULO 2- FUNGAL EXTRACELLULAR ENZYMES AND MODULATION OF PLANT DEFENSE RESPONSES BY *Colletotrichum fructicola* IN APPLE LEAVES

Aline Cristina VELHO¹, Mathias F. ROCKENBACH¹, Pedro MONDINO², Marciel J. STADNIK¹

¹ Laboratory of Plant Pathology, Agricultural Science Center, Federal University of Santa Catarina. Rod.Admar Gonzaga 1346, 88034-001 Florianópolis-SC, Brazil.

² Department of Plant Protection, Faculty of Agronomy, University of the Republic. Av. Garzón 780, CP 12900, Montevideo, Uruguay.

5.1. ABSTRACT

Colletotrichum fructicola is associated with Apple bitter rot (ABR) and Glomerella leaf spot (GLS). Although both diseases can occur simultaneously in orchards, some isolates show clear tissue specialization. Thus, this work was aimed at comparing ABR- and GLS-specialized isolates in terms of fungal extracellular enzymes and effects on the plant oxidative stress machinery enzymes during the leaf infection process. In culture, ABR-isolate exhibited higher levels of laccase and pectin lyase, but not polygalacturonase. On leaves, GLS-isolate formed appressoria mostly sessile, while ABR-isolate pedicellate. ABR-isolate germlings formed multiple melanized appressoria probably as a sign of unsuccessful infection attempts. H₂O₂ accumulation was rarely visualized at infection sites and was not associated with hypersensitive response. GLS-isolate markedly increased the electrolyte leakage at 48 hours after infection (HAI) reflecting its transition from the biotrophic into the necrotrophic phase. Both isolates influenced differently oxidative stress enzymes, increasing the activities of guaiacol peroxidase, catalase and glutathione reductase at different times, except for superoxide dismutase that remained unaltered. Ascorbate peroxidase activity was only affected with GLS-isolate at 6 HAI. GLS-isolate reduced H₂O₂ accumulation in leaves at 48 HAI, suggesting that antioxidative enzymes act more efficiently in scavenging reactive oxygen species and avoiding cell death. GLS-isolate seems, therefore, to have a mechanism to suppress plant defence responses.

Keywords: Apple bitter rot, *Colletotrichum fructicola*, Glomerella leaf spot, Pectinases, oxidative stress enzymes, reactive oxygen species.

5.2. INTRODUCTION

Colletotrichum is a very destructive plant pathogenic fungus, causing diseases in a wide range of hosts throughout the world (Cannon et al. 2012). Within this genus, *Colletotrichum fructicola* Prihastuti, Cai & Hyde (formerly *Colletotrichum gloeosporioides*) has been considered the most biologically and geographically diverse species frequently infecting fruit trees (Phoulivong et al. 2012). On apple (*Malus domestica* Borkh.), it can cause two distinct diseases, i.e., Apple bitter rot (ABR) and Glomerella leaf spot (GLS) (Velho et al. 2015).

ABR is a widespread old fruit rot disease occurring in most regions where apple trees grow and in southern Brazil, it can provoke losses up to 50 % at pre and post-harvest stages (Denardi et al. 2003). First symptoms appear as light brown fruit lesions that over time enlarge becoming dark brown, sunken and water-soaked in appearance. Fruits of most apple cultivars, including ‘Gala’, are susceptible to infection and subsequent colonization by the fungus (Velho et al. 2014b).

In contrast to ABR, GLS is an emerging disease whose incidence has increased in the past 30 years particularly in the subtropics (Velho et al. 2014a), where frequent rainfall and higher temperatures during summer has dramatically favored its development. GLS symptoms appear as reddish-purple spots as soon as two days after infection. Spots coalesce evolving to irregular necrotic lesions between 7 and 10 days, when leaves often turn yellow and fall off (Araújo and Stadnik 2013). In general, younger leaves are more susceptible to infection. Early and severe defoliation, not only causes an immediate reduction in yield, but weakens apple trees and compromises the production in following years (Gonzalez et al. 2006). On fruits, it can cause small light brown slightly sunken lesions (1-3 mm) which do not increase in size over time. In Brazil, the most widely grown cultivar (‘Gala’) is highly susceptible to GLS (Araújo and Stadnik 2013).

Although both diseases can occur simultaneously in orchards, isolates with a clear tissue specialization has been found (Velho et al. 2015). Physiological and genetical causes for such differences in terms of ability to provoke different symptoms remain, however, fully uncovered.

Colletotrichum fructicola is characterized by a hemibiotrophic lifestyle, which combines an initial short biotrophic phase, followed by highly destructive necrotrophic development killing extended tissue areas of host plants (Münch et al. 2008). For successful penetration and subsequent colonization specific infection structures are sequentially formed. After landing on a plant surface, conidia germinate, form a short germ tube and undergo a complex differentiation to form sessile or pedicellate appressoria (Araújo et al. 2014). As the appressorium mature, glycerol accumulation and melanin layer are included into the appressorial cell leading to generation of enormous turgor pressure that allows the penetration peg to pass through the plant cell wall (Deising et al. 2000). Direct penetration occurs probably by a coordinated combination of mechanical pressure and action of some cuticle- and cell wall degrading enzymes (e.g. cutinases and pectinases) which help cell penetration and spreading through plant tissue (Bailey et al. 1992; Kubicek et al. 2014).

After entering the cell, the fungus starts to produce other enzymes and compounds important to colonize plant tissue (Herrera et al. 2004). One group of such enzymes is composed of the called pectinases which are secreted by the pathogen to hydrolyze pectin during infection (Shih et al. 2000; Kubicek et al. 2014). Polygalacturonases (PG) and pectin lyases (PL) are the main pectinases secreted by fungus and play an important role in the pathogenicity. While PG cleaves α -1, 4 glycosidic bonds between two galacturonic acid residues, PL is responsible to degrade pectin polymers directly by β -elimination mechanism (Gregori et al. 2007). PG is the first cell-wall-degrading enzyme synthesized by phytopathogenic fungi and acts mainly during the initial biotrophic phase, and less in the later stage of infection (Bailey et al. 1992). PL is important especially during necrotrophic phase, but also involved in the switch from biotrophic to necrotrophic phase (Shih et al. 2000).

Pectinases as pathogenicity factor of *C. gloeosporioides* (Yakoby et al. 2001), *C. magna* (Wattad et al. 1995), *C. truncatum* (Ramos et al. 2010), and *C. lindemuthianum* (Herbert et al 2004) have been considered. These enzymes play a dual role in pathogenicity by inducing cell wall degradation and defence gene expression in the host plant, such as, phytoalexins, pathogenesis-related (PR) proteins, proteinase inhibitors, lignin

and hydroxyproline-rich glycoproteins (Herrera et al. 2004). For instance, oligogalacturonic acids derived from PG, elicit defence reactions including the production of ROS and the secretion of antifungal proteins (Gomathi et al. 2004).

Laccases (LAC), also known as p-diphenol oxidases, are extracellular enzymes widely found in fungi, and have a variety of biological activities, such as, lignin degradation (Baldrian 2006), detoxification of antifungal compounds, fungal virulence and appressorial melanization (Guetsky et al. 2005; Lin et al. 2012). In *C. gloeosporioides*, LAC has an important role in pathogenicity by detoxifying epicatechin in avocado and capsaicin in chili pepper (Guetsky et al. 2005; Liao et al. 2012). Furthermore, LAC seems to be involved in the suppression of defence responses as demonstrated by Chi et al. (2009), who found that mutants of *Magnaporthe oryzae* with decreased LAC activity were unable to suppress resistance in rice plants and to cause leaf rice blast.

After pathogen recognition, localized biochemical events rapidly occur to avoid the further development of the pathogen in plant tissues. One of the earliest consists in a rapid and transient formation of reactive oxygen species (ROS) (Baker and Orlandi 1995). The so-called oxidative burst is responsible for triggering the cascade of events that result in activation of plant defence responses. NADPH oxidase, xanthine oxidase, oxalate oxidases and peroxidases have been implicated in ROS generation (Lamb and Dixon 1997; O'Brien et al. 2012). ROS are primarily anion superoxide (O_2^-), hydroxyl radical (OH) and hydrogen peroxide (H_2O_2), all of them affecting cellular processes in plant-pathogen interactions (Shetty et al 2003).

In plants, ROS are involved in different signalling pathways, such as triggering of hypersensitive response (HR) (Thordal-Christensen et al. 1997), defence gene expression, ion fluxes, cell wall protein cross-linking, accumulation of phytoalexins, and lignin accumulation (Lamb and Dixon 1997). Moreover, ROS can react with proteins, membrane lipids increasing electrolyte leakage and accelerate cell death (O'Brien et al. 2012). In order to maintain the ROS concentration below a toxic threshold, an antioxidant enzyme system is activated. The major enzymes include guaiacol peroxidase (GPOD), ascorbate peroxidase (APX), catalase (CAT), glutathione reductase (GR) and superoxide dismutase (SOD). Together, these enzymes

provide cells with highly efficient machinery for detoxifying O_2^- and H_2O_2 (Mittler et al. 2011); and their involvement in plant defence responses has been demonstrated in numerous studies. Araújo and Stadnik (2013) reported that cultivar-specific and induced resistance to GLS were associated with increase of GPOD activity.

Successful fungal pathogen establishment depends on a series of events leading to production of extracellular enzymes and overcoming plant defence responses. Thus, this work was aimed at comparing ABR- and GLS-specialized isolates in terms of the fungal extracellular enzymes LAC, PL and PG, and the effects on the plant oxidative stress machinery during the leaf infection process.

5.3. MATERIAL AND METHODS

5.3.1. *Colletotrichum* isolates

Colletotrichum fructicola isolates MANE40 and MANE147 were originated from fruits and leaves with ABR- and GLS symptoms, respectively. Both isolates were previously identified by Velho et al. (2015), and deposited in the mycological collection (MANE) of the Laboratory of Plant Pathology, Federal University of Santa Catarina, Brazil.

For the experiments, pure cultures of the fungus were grown on potato dextrose agar medium (PDA-Himedia Labs) at $\pm 25^\circ C$ and 12 h photoperiod under fluorescent light for 15 days.

5.3.2. Determination of activity of fungal extracellular enzymes

To obtain extracellular enzymes, fungus was first grown in sterile 100-mL Erlenmeyer flasks with 20-mL basal broth medium composed of 10 g apple-pectin; 4 g asparagine monohydrate; 0.5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0.5 g H_2KPO_4 ; 0.6 g HK_2PO_4 ; 0.4 mg $CuSO_4 \cdot 5H_2O$; 0.09 mg $MnCl_2 \cdot 4H_2O$; 0.07 mg H_3BO_3 ; 0.02 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$; 1 mg $FeCl_3$; 3.5 mg $ZnCl_2$; 0.1 mg of thiamine hydrochloride and 1000 mL of distilled water (pH 3.5) (Ramos et al. 2010). One 5-mm agar plug from *C. fructicola* isolate was added to each flask and incubated without agitation at $\pm 25^\circ C$ and 12 h photoperiod under fluorescent light. Mycelium

was harvested after 10 days by filtration through a Whatman n°1 filter paper using a Buchner funnel. Dry weight of mycelium was determined after drying it to a constant weight at 70 °C. The culture supernatants were used as enzyme extracts.

Laccase (LAC EC 1.10.3.2) activity was determined with 100 µL of 0.5 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in 800 µL of 0.1 M sodium acetate buffer (pH 3.5) and 100 µL of enzyme extract at 30°C. Oxidation of ABTS was measured by the increase in absorbance at 420 nm ($\epsilon_{420} = 36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Levin et al. 2007). Enzymatic activity was expressed in International Units (U) as the amount of ABTS needed to oxidize 1 µmol of substrate per min.

Pectin lyase (PL EC 4.2.2.10) activity was assayed by the thiobarbituric acid (TBA) method (Ramos et al. 2010). The reaction mixture contained 0.5 mL of 1.2 % pectin in 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) and 0.5 mL of enzyme extract. Samples were prepared in test tubes and incubated at 30 °C for 1 h. After incubation, 0.75 mL of 1 N HCl and 1.25 mL of 0.04 M TBA were added and kept at 100°C for 20 min. After cooling, absorbance was measured at 550 nm. Enzymatic activity of PL was expressed in International Units (U) as the amount of enzyme needed to oxidize 1 µmol of substrate per min.

Polygalacturonase (PG EC 3.2.1.15) activity was assayed using the dinitrosalicylic acid (DNS) method (Tewari et al. 2004). The reaction mixture contained 0.2 mL of 0.2 M acetate buffer (pH 4.5), 0.3 mL of 1% polygalacturonic acid and 1 mL of enzyme extract. Samples were incubated at 37 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding DNS solution and then water boiled for 5 min. After cooling the absorbance was measured at 520 nm. Enzymatic activity of PG was expressed in International Units (U) as the amount of enzyme needed to release 1 µmol of galacturonic acid per minute.

Protein concentration was determined using the Bradford method (Bradford, 1976), and bovine serum albumin (BSA) served as standard.

5.3.3. Leaf infection assay

Susceptible apple seedlings were produced from 'Gala' x 'Fuji' cross seeds according to Araújo and Stadnik (2013). Plants

were grown in individual pots under greenhouse conditions at 25 ± 5 °C until having c. 12 expanded leaves.

For inoculation, whole plants were sprayed with a suspension of 1×10^6 conidia mL^{-1} using an atomizer connected to an air compressor (58 psi) and delivering approximately 4.5 mL plant^{-1} . Plants sprayed with sterile distilled water served as control. All plants were kept at ± 25 °C and 100 % relative humidity in the dark for 48 h. Then, they were transferred to the greenhouse again.

Necrotic leaf severity (%) was assessed on 10th day after inoculation. For this, upper (1st to 4th) and lower (5th to 10th) leaves were detached, digitally scanned and the percentage of infected area was determined for each group using the software Quant[®] (v.1.02, Federal University of Viçosa 2003).

5.3.4. Microscopical analysis

In order to visualize H_2O_2 accumulation and fungal growth, four 10-mm discs were cut from 4th expanded leaf at 3, 6, 12, 24 and 48 HAI. For H_2O_2 visualization in situ, discs were immediately submerged in 3, 3'-diaminobenzidine (DAB) solution (1 mg mL^{-1} , pH 3.8) as described by Thordal-Christensen et al. (1997). Tissues were vacuum-infiltrated with DAB solution for 10 min and then placed overnight in darkness at 25 °C. Discs were placed in ethanol: chloroform (v/v 4:1) solution and 0.15 % TCA for 24 h, and thereafter in a chloral hydrate solution (2.5 g mL^{-1}) until complete bleaching.

To visualize fungal growth, the DAB-treated leaf discs were further stained with lactophenol–cotton blue for 5 min and mounted on glass slides with 50 % glycerol. Microscopical analyses were performed using a light microscope (FWL1500, Feldmann Wild Leitz, Brazil) with 400 x magnification.

H_2O_2 accumulation was determined by reddish-brown staining in epidermal cells caused by oxidative polymerization of DAB and the total number of cells DAB-stained were counted. Conidial germination and appressorium formation were randomly determined on 100 conidia per leaf disc. Conidial germination was classified as percentage of germinated conidia (germlings); germlings with one appressorium and germlings with multiple appressoria. Appressorium formation was classified according to

their shape (irregular, oval and circular); type (sessile or pedicellate) and melanization (hyaline or melanized).

5.3.5. Electrolyte leakage

In order to determine the electrolyte leakage (ion leakage from the damaged cell), 5th expanded leaf of each plant was collected at 24 and 48 HAI, washed and immediately put into test tubes with 20 mL of deionized water at ± 25 °C. Electrolyte leakage was taken every hour for 12 h using a conductivity meter (Lutron, model CD-4301). Leaves of six different seedlings were used for each isolate and control. Ion leakage was expressed as microSiemens (μS).

5.3.6. Leaf enzyme assays and H_2O_2 quantification

Determination of the activity of oxidative stress enzymes and hydrogen peroxide (H_2O_2) quantification were performed at 0, 6, 12, 24 and 48 hours after inoculation (HAI). For each sampling time, 1st and 2nd fully expanded leaves were collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until use.

For enzyme extraction, apple leaves were homogenized using a pre-chilled mortar and pestle, with 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 1 mM of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 3 mM of DL-dithiothreitol (DTT) and 2 % of polyvinylpyrrolidone (PVP) in the proportion of 1:4 (w v⁻¹). The suspension was centrifuged at $20,000 \times g$ for 30 min at 4 °C and the supernatant was collected and placed on ice for further determination of protein content and enzyme activities. Protein concentration was determined as previously described.

Guaiacol peroxidase (GPOD EC 1.11.1.7) activity was assayed according to Araújo and Stadnik (2013). The reaction mixture contained 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.5), 0.25 % guaiacol, 100 mM H_2O_2 and the enzyme extract due to guaiacol oxidation. The enzyme activity was determined by monitoring the increase in absorbance at 470 nm ($\epsilon_{470} = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) during four minutes. Results were expressed in katal mg protein^{-1} , where 1 katal represents the amount of enzyme converting 1 M of substrate s^{-1} .

Catalase (CAT EC 1.11.1.6) activity was assayed according to Elavarthi and Martin (2010) with minor modifications. The reaction mixture contained 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), 30 mM H₂O₂, and the crude enzyme extract. The enzyme activity was determined by monitoring the decomposition of H₂O₂ at 240 nm ($\epsilon_{240}=36 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) during four minutes. The CAT activity was expressed as katal mg protein⁻¹.

Ascorbate peroxidase (APX EC 1.11.1.11) activity was assayed according Nakano and Asada (1981) with minor modifications. The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.5 mM L-ascorbic acid, 0.2 mM H₂O₂ and the crude enzyme extract. The enzyme activity was determined by monitoring the decrease of absorbance at 290 nm ($\epsilon_{290}=2.8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) during four minutes. The APX activity was expressed as katal mg protein⁻¹.

Glutathione reductase (GR EC 1.6.4.2) activity was assayed according Elavarthi and Martin (2010) with minor modifications. The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 10 mM β -nicotinamide adenine dinucleotide (NADPH), 10 mM L-glutathione oxidized (GSSG), 3 mM 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 2 mM EDTA and the crude enzyme extract. The enzyme activity was determined by monitoring the increase of absorbance at 412 nm ($\epsilon_{412}=6.2 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) during four minutes. The GR activity was expressed as katal mg protein⁻¹.

Superoxide dismutase (SOD EC 1.15.1.1) activity was determined by measuring its ability to inhibit the photochemical reduction of nitro-blue tetrazolium (NBT) by O₂⁻ as described by Esfandiari et al. (2010). The reaction mixture contained 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.8), 200 mM L-methionine, 1 mM riboflavin, 2.25 mM NBT, 2 mM EDTA, 0.025 % Triton X-100 and the crude enzyme extract. Samples were prepared in test tubes and the reaction was started placing the tubes under a fluorescent lamp (15 W) for 15 minutes at a distance of 15 cm. Non-illuminated tubes served as a blank. The enzyme activity was determined observing the formation of blue formazan and measuring the absorbance at 560 nm. SOD activity was expressed as U mg protein⁻¹, where one unit (U) was defined as the amount of enzyme required to cause 50 % inhibition of the NBT.

Hydrogen peroxide content was determined as described by Esfandiari et al. (2010). For each sampling time, 3rd expanded leaf was collected and homogenized using a mortar and pestle with 0.1 % trichloroacetic acid (TCA) in the proportion of 1:4 (w v⁻¹). The suspension was centrifuged at 20,000 × g for 30 min and the supernatant was collected. In order to start the reaction 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and 1 M potassium iodide (KI) were added. After 10 min of reaction at room temperature, the absorbance was read at 390 nm. The content of H₂O₂ was given on standard curve and expressed as μM H₂O₂ g⁻¹ FW (fresh weight).

5.3.7. Experimental design and statistical analyses

The experiments were arranged in a completely randomized design using six replicates for each treatment and were repeated twice. Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) in order to determine the significance of differences. Means were compared by Tukey's test ($p \leq 0.05$) using SAS program (v.9.1 SAS Institute, Inc., Cary, NC).

5.4. RESULTS

5.4.1. Activity of fungal extracellular enzymes

All isolates were able to grow in basal broth medium and produced around 2.5 mg mL⁻¹ of dried mycelium after a 10-day incubation period.

ABR-isolate had higher levels of the three enzymes evaluated. LAC activity was five-fold higher in broth extracts cultured with ABR- than GLS-isolate showing values of 10 and 2.1 U mg of protein⁻¹, respectively (Fig 1A). In spite of low content, PL activity was also significantly higher for ABR- than for GLS-isolate, with 0.05 and 0.02 U mg of protein⁻¹, respectively (Fig 1B). The PG activity was not statistically different between ABR- and GLS-isolate (Fig 1C).

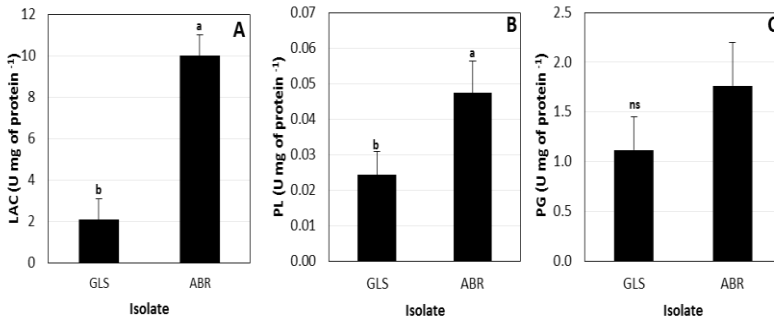


Fig 1 - Enzyme activities of Laccase (A), Pectin lyase (B) and Polygalacturonase (C) of *Colletotrichum fructicola* isolates grown in broth medium at $\pm 25^{\circ}\text{C}$ and 12 h photoperiod under fluorescent light for 10 days. Means followed by different letter are significantly different according to Tukey test ($p \leq 0.05$). Bars represent mean \pm standard deviation.

5.4.2. Leaf infection

First symptoms on apple seedlings appeared as reddish-purple spots two days after inoculation with GLS-isolate. The spots evolved into necrotic lesions and the disease severity ten days after inoculation reached 9.7 and 7.1 % on upper and lower leaves, respectively. In contrast, plants inoculated with ABR-isolate and controls (water-treated) did not exhibit any symptom (Figure 2).

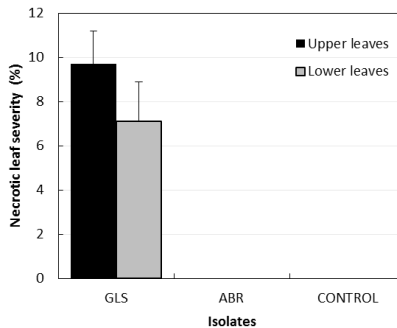


Fig 2 - Severity of Glomerella leaf spot (GLS) in apple seedlings 10 days after inoculation with pathogenic *Colletotrichum fructicola* isolates. The severity of upper and lower leaves was determined using the software Quant[®].

5.4.3. Microscopical analysis

Up to 24 HAI, there was no H_2O_2 accumulation in epidermal cell walls. H_2O_2 accumulation was seldomly detectable in both ABR- and GLS-infected leaf tissues at 48 HAI, and no relationship could be established with fungus structures. In general, the reaction with DAB staining was observed in the entire outline of the anticlinal cell walls (Fig 3A), and less frequently in whole epidermal cells (Fig 3B).

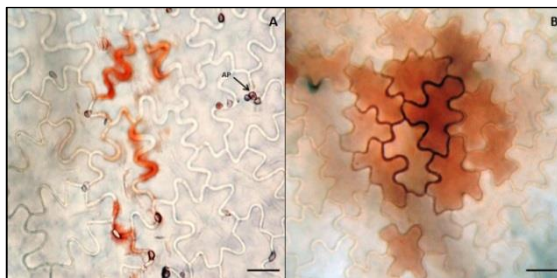


Fig 3-Histochemical detection of H_2O_2 accumulation in susceptible apple leaves 48 hours after inoculation (HAI) with *Colletotrichum fructicola* (GLS-isolate) (A) H_2O_2 accumulation in some parts of the anticlinal cell wall and not associated to conidia and appressoria formation; (B) H_2O_2 accumulation in epidermal cell. The brown staining indicates the formation of a polymerization product when H_2O_2 reacts with DAB. AP=appressorium. Scale bar=50 μ m.

Conidial germination increased linearly after inoculation and the germ tubes emerged mostly from the each end of conidia. In general, conidia of GLS-isolate germinated faster than those of ABR-isolate reaching the maximum conidial germination at 48 HAI, with 96 % for GLS- and 85 % for ABR-isolate (Fig 4A). Conidia of both isolates were able to form appressoria, and GLS-isolate exhibited 30 % more germlings with one appressoria than ABR-isolate throughout the evaluation period (Fig 4B). In contrast, ABR-isolate developed more germlings with multiple appressoria after 12 h (Fig 4C).

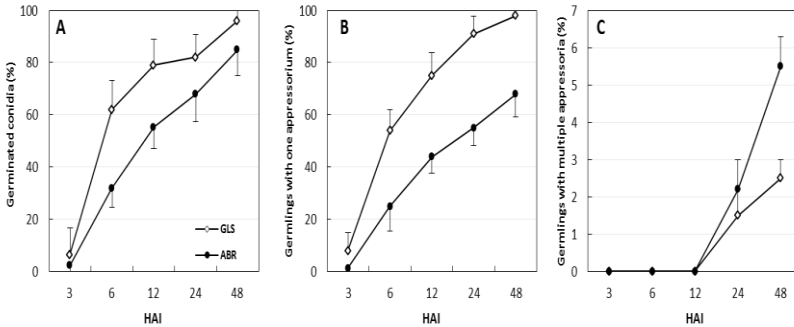


Fig 4- (A) Percentage of germinated conidia; (B) Germinated conidia with one appressorium; (C) Germinated conidia with multiple appressoria on apple leaves inoculated with *Colletotrichum fructicola* isolates.

Appressorial shape of both isolates was predominately oval (Fig 5A). GLS-isolate formed appressoria mostly sessile, while ABR-isolate pedicellate (Fig 5B), being 85% of them for both isolates were melanized (Fig 5C). Appressoria frequently developed over anticlinal host walls, but occasionally, over periclinal walls.

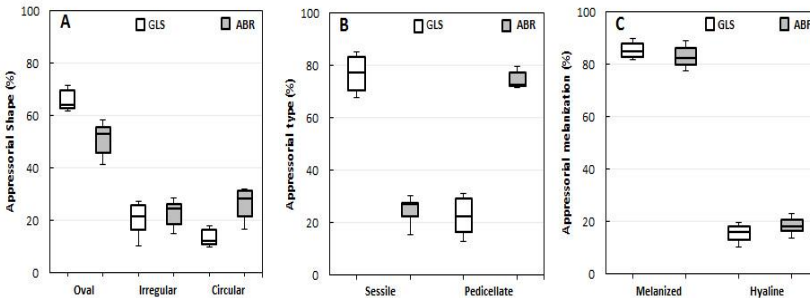


Fig 5- (A) Box plots showing the variation in appressorial shape; (B) Appressorial type; (C) Appressorial melanization in apple leaves inoculated with *Colletotrichum fructicola* isolates.

5.4.4. Electrolyte leakage

At 24 HAI, inoculated leaves and control showed a lower and constant rate of electrolyte leakage reaching a maximum value of $4.8 \mu\text{S}$ within 12 h of evaluation (Fig 6A). However, at

48 HAI the electrolyte leakage in inoculated leaves with GLS-isolate was three fold-higher than those with ABR-isolate and control over 12 h (Fig 6B).

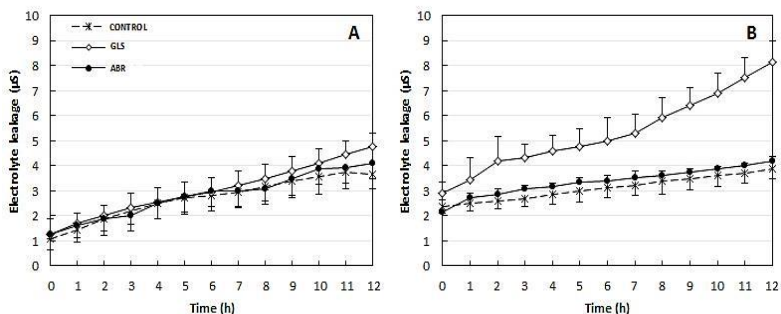


Fig 6-Time course of electrolyte leakage (μS) in apple leaves at 24 (A) and 48 (B) hours after inoculation (HAI) with *Colletotrichum fructicola* isolates. Bars represent mean \pm standard deviation.

5.4.5. Leaf enzyme assays and H_2O_2 quantification

Significant differences in the kinetics of oxidative stress enzymes were found in inoculated- and control plants. GPOD activity increased throughout the time-course in inoculated plants compared with control. The activity was higher in inoculated plants with GLS-isolate at 12, 24 and 48 HAI, but significant differences between isolates occurred solely at 48 HAI. Compared with control, inoculated plants with GLS-isolate had GPOD activity significantly two fold-higher at 12, 24 and 48 HAI, whereas for ABR-isolate was significantly higher only at 24 HAI (Fig 7A).

CAT activity was significantly higher in inoculated plants with GLS-isolate at 6 and 12 HAI than those ABR-isolate and control. The increase of CAT activity in GLS-isolate began at first 6 HAI, while ABR-isolate increased after 12 HAI, showing a peak at 24 HAI. After 24 HAI, both decreased until the last sampling time (Fig 7B).

APX activity increased significantly in inoculated plants with GLS-isolate at 6 HAI and was two and three-fold higher than ABR-isolate and control, respectively. APX activity did not vary significantly in inoculated plants with ABR-isolate and control at all sampling time (Fig 7C).

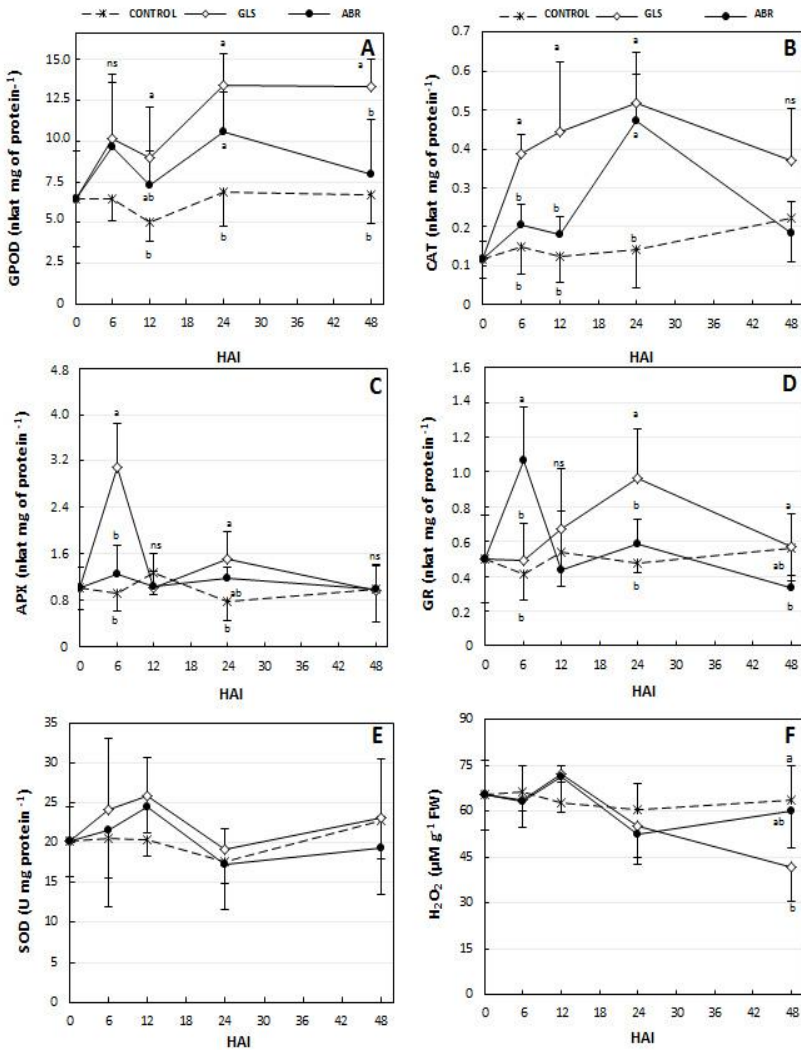


Fig 7-Time course of guaiacol peroxidase (A), catalase (B), ascorbate peroxidase (C), glutathione reductase (D), superoxide dismutase (E) activity and hydrogen peroxide content (F) in apple leaves inoculated with pathogenic *Colletotrichum fructicola* isolates causing ABR and GLS. Different letters indicate statistically significant differences among treatments for each sampling time according to Tukey test ($p \leq 0.05$). Bars represent mean \pm standard deviation.

GR activity increased for both isolates, but at different times. Inoculated plants with ABR-isolate showed a peak at 6 HAI, while those inoculated with GLS-isolate increased up to 24 HAI and were approximately 60% higher than ABR-isolate and control. Inoculated plants with GLS-isolate had GR activity significantly higher than control at 24 and 48 HAI (7D).

SOD activity slightly increased in inoculated plants up to 12 HAI, but there was no significant differences among the treatments in all times evaluated (Fig 7E).

In relation to H_2O_2 content, the highest concentration ($71.4 \mu M H_2O_2 g^{-1} FW$) was found in inoculated plants at 12 HAI. After 12 HAI, inoculated plants with GLS-isolate exhibited a marked decrease (about 40 %) until 48 HAI when compared to ABR-isolate and control. Nevertheless, control plants showed a constant production of H_2O_2 , around $62.4 \mu M g^{-1} FW$ over time. Significant differences occurred only at 48 HAI, in which control plants showed higher H_2O_2 levels ($63.4 \mu M g^{-1} FW$) than those inoculated with GLS-isolate ($41.6 \mu M g^{-1} FW$) (Fig 7F).

5.5. DISCUSSION

Colletotrichum fructicola has different strategies to colonize and interact with their hosts and the activity of extracellular enzymes clearly demonstrates differences between ABR- and GLS-isolate.

ABR-isolate exhibited high levels of PL and LAC when compared to GLS-isolate, while none differ in PG. Pectinolytic enzymes, such as, PG and PL have been shown a major role in colonization and can determine the level of virulence of *Colletotrichum* isolates in both fruits and leaves (Bailey et al. 1992). ABR- and GLS-isolate have clear differences in tissue specialization and this was associated with these enzymes. In general, *Colletotrichum* isolates deficient in such enzymes seem to be less virulent as demonstrated with gene disruption studies (Wattad et al. 1995).

Efficacy of pectinolytic enzymes to degrade cell walls may depend upon the structure of host cell (Kubicek et al. 2014) and, the different isoforms of PGs and PLs during colonization of infected tissues (Shih et al. 2000; Yakoby et al. 2001). Although these enzymes are markedly important for typical soft rot in

fruits, their role in pathogens that cause leaf diseases has not been established so far. In our study, isolates produced small amounts of inducible pectinolytic enzymes and results suggest that major enzyme involved in pathogenesis of ABR-isolate is PL. According to Reignault et al. (2008) different degradation pathways and expression patterns of pectinolytic enzymes may lead to a greater fungal adaptability on distinct host plant tissues. Thus, this might explain the differences between isolates in infect fruits and leaves.

LACs are known to help fungi to eliminate toxic plant metabolites (Guetsky et al. 2005). These metabolites, such as, polyphenols, phytoalexins and other fungitoxic substances present or induced differ markedly during leaf and fruit development (Terry et al. 2004). Interestingly, it was reported that fruits produce higher levels of antifungal compounds than leaves (Prusky et al. 2013). According to Guetsky et al. (2005), highest LAC activity was detected during fruit decay development. Therefore, a higher level of such enzyme may be an adaptative advantage for specialized isolates to infect fruits, like ABR-isolate.

Microscopic observations showed temporal difference in pattern of conidial germination and appressorium formation between *C. fruticola* isolates. Conidial germination started approximately 3 HAI solely on adaxial surface of leaves and results are in agreement with Araújo et al. (2014). Furthermore, GLS-isolate germinated faster and produced more germlings with one appressoria than those of ABR-isolate. Appressoria are highly specialized infection structures and are formed according to the physical and chemical surface signals provided by the host cuticle in *Colletotrichum* species (Deising et al. 2000). In *C. gloeosporioides*, host surface wax components have been shown to induce germination and appressorium differentiation (Mendgen and Deising 1993). GLS-isolate produced more germlings with one appressoria due the greatest host surface-affinity.

In spite of the small percentage (5.5 %), ABR-isolate developed more germlings with multiple appressoria than GLS-isolate indicating that penetration was impaired. This behavior can be attributed to multiple unsuccessful infection attempts, since ABR-isolate does not have the ability to cause leaf disease. Araújo et al. (2014) also showed that virulent isolates produced multiple appressoria on resistant leaves than on susceptible ones.

Both isolates formed predominately oval appressoria, in accordance to taxonomical characteristics described for *C. fructicola* (Velho et al. 2015). However, GLS-isolate formed mainly sessile, while ABR-isolate pedicellate appressoria. Previous studies also showed that *Colletotrichum* appressoria are often sessile because the formation of a long germ tube involves high-energy expenditure (Deising et al. 2000). Moreover, appressorial melanization is also required for *Colletotrichum* infection, and in this study, both isolates formed melanized appressoria.

No hypersensitive response (HR) was observed using DAB staining for both isolates. The brown staining visualized in some discs was never associated with fungal infection. Similar observation was reported in wheat infected by the hemibiotrophic pathogen *Septoria tritici* (Shetty et al. 2003). HR is associated with plant resistance mechanism and involves programmed cell death (PCD) at site of pathogen entry and around the infection (Thordal-Christensen et al. 1997; Iakimova et al. 2006). HR is often, although not always, associated with resistance against hemibiotrophic pathogens. The nonadapted ABR-isolate could trigger HR, but, results suggest that both diseases, ABR and GLS seem to be independent of HR.

Other forms of disease resistance can occur to prevent pathogen growth, i.e. barriers of lignin, suberin, callose and synthesis of phytoalexins (Lamb and Dixon 1997; Thordal-Christensen et al. 1997). In turn, penetration of ABR-isolate could be associated to the callose deposition at sites of attempted fungal penetration. However, this response in apple leaves needs further investigation.

Tissue damage can also be considered through electrolyte leakage. A basal rate of electrolyte leakage was observed during the first 24 HAI in inoculated leaves with both isolates and control. However, at 48 HAI the leakage increased considerably in GLS-isolate, which suggests that isolate have ability to infect and colonize host tissues causing permanent cell membrane damages and leading to cell death. Considering this situation we can therefore conclude that, GLS-isolate seems to have an initial biotrophic interaction that lasts at least 24 h followed by a necrotrophic development.

ABR- and GLS-isolate influenced differently the oxidative stress enzymes behavior, increasing the activities of

GPOD, CAT and GR in apple plants at different times, except for SOD that remained unaltered during the 48 h-period after inoculation. GLS-isolate enhanced in overall the activity of most anti-oxidative enzymes, whereas ABR-isolate only caused punctual increases. GLS-isolate seems, therefore, to elicit stronger oxidative responses in apple plants than ABR-isolate. In turn, plants infected by GLS-isolate try to avoid the ROS accumulation that otherwise would kill plant cells and, consequently, the fungus in its biotrophic phase. Interestingly, a lower level of H₂O₂ could be histochemically determined in GLS-infected leaves at 48 HAI that could be explained by the stronger activity of anti-oxidative enzymes.

Enzymes that regulate ROS production can act in different ways according to different pathogen lifestyles (Iakimova et al. 2006; Heller and Tudzynski 2011) but, for the hemibiotrophic *C. fructicola*, mechanisms of ROS accumulation are poorly understood. Generally, the rapid generation and scavenging of ROS, especially H₂O₂ in plant-pathogen interactions needs to be tightly regulated. Modulation of ROS levels involve a positive feedback between ROS production and ROS scavenging in different cellular compartments as well as for protection against oxidative damage (Mittler et al. 2011).

In our study, the increase of ROS scavenging enzymes GPOD, CAT and GR in the first hours after inoculation can be resulted of a compatible interaction and can be an attempt to detoxification. PODs generally enhance their activity after a pathogen attack and at the same time act as a ROS scavenger depending upon plant species and stresses conditions (Mittler et al. 2011). Increase of GPOD in both isolates, probably occurred as a mechanism to activate defence reaction. Araújo and Stadnik et al. (2013) found that *C. gloeosporioides* induced GPOD activity three fold-higher in resistant than susceptible apple plants.

CAT activity was also higher in inoculated plants with GLS- than ABR-isolate probably in response to H₂O₂ increase. CAT is considered the major system for the enzymatic removal of H₂O₂ in plants because convert molecules of H₂O₂ into H₂O very rapidly (Baker and Orlandi 1995). APX and GR are two important enzymes involved in ascorbate-glutathione cycle and are directly involved in H₂O₂ detoxification by sustaining the reduced status of ascorbate and glutathione. The reduced status of ascorbate produced oxidized glutathione (GSSG), which is

reduced by GR using NADPH as electron donor (Lamb and Dixon 1997). This cascade effect can be observed in GLS-infected plants, since the first increase in APX occurred at 6 HAI while GR increased after this time.

In relation to SOD, its activity occurs rapidly after pathogen attack and is considered the first line of defence against the toxic effects of elevated levels of ROS. Being a rapid reaction, it is possible that differences could be detected before 6 h.

The accumulation of ROS, particularly H_2O_2 culminates with HR and localized PCD (Heller and Tudzynski 2011). There were no significant changes in apple plants in H_2O_2 content until 24 HAI, but, after this time GLS-isolate decreased its levels, when compared with both ABR-infected- and control plants. This behavior can be explained by the partial destruction of the generated ROS in the early hours, since activities of GPOD, CAT and GR were enhanced.

The behavior of *C. fructicola* in this study showed that the activation of scavenging enzymes occurred mainly in the first hours of infection, as an attempt to trigger plant defence responses. ABR-isolate appears to be unable to penetrate the tissues, therefore it is expected that these responses are less pronounced and do not trigger HR. However, GLS-isolate seems to have a mechanism to suppress plant defence responses. The removal of H_2O_2 triggered by oxidative stress enzymes could possibly favors infection of GLS-isolate by avoiding HR.

C. fructicola isolates can have a great adaptability in attacking fruits or leaves, which differ in pectin structure, through differences in extracellular enzymes production. Our findings demonstrate the first evidences that modulation of plant defence responses in response to *C. fructicola* infection involve activating and suppressing of different cellular responses during pathogenesis. Thus, this study provides novel information about the production of fungal extracellular enzymes and activity of plant oxidative stress enzymes in response to *C. fructicola*.

Acknowledgements

We thank the Brazilian agency CAPES (Coordination for the improvement of higher education Personnel) for financial support (Grant: PPCP-MERCOSUL 022/2011). M.J.S is a

research member of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

5.6. REFERENCES

Araújo L, Gonçalves AE, Stadnik MJ, 2014. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica*, 42: 631-640. doi.org/10.1007/s12600-014-0404-7

Araújo L, Stadnik MJ, 2013. Cultivar-specific and ulvan-induced resistance of apple plants to *Glomerella* leaf spot are associated to an enhanced activity of peroxidases. *Acta Scientiarum*, 35:(3) 283-287. doi.org/10.4025/actasciagron.v35i3.16174

Bailey JA, O'Connell RJ, Pring RJ, Nash C, Jeger MJ, 1992. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: *Colletotrichum: Biology, pathology and control*, Wallingford, Oxon, UK: Commonwealth Agricultural Bureau International, 88 – 120.

Baker CJ, Orlandi EW, 1995. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, 33: (1), 299-321. doi.org/10.1146/annurev.py.33.090195.001503

Baldrian P, 2006. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, 30:(2), 215-242. doi.org/10.1111/j.1574-4976.2005.00010.x

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72:(1), 248-254. doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS, 2012. *Colletotrichum* current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73:181-213. doi.org/10.3114/sim0014

Chi MH, Park SY, Kim S, Lee YH, 2009 A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. *PLoS Pathogens*, 5:(4) e1000401. doi.org/10.1371/journal.ppat.1000401

Denardi F, Berton O, Spengler MM, 2003. Genetic resistance to bitter rot on apples determined by the development rate of the disease on fruits with and without wounds. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 25:(3), 494-497. doi.org/10.1590/S0100-29452003000300033

Deising HB, Werner S, Wernitz M, 2000. The role of fungal appressoria in plant infection: Review. *Microbes and Infection*, 2:(13), 1631–1641. doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01319-8

Elavarthi S, Martin B. Spectrophotometric assays for antioxidant enzymes in plants. *Plant Stress Tolerance - Methods in Molecular Biology*, 639:(3), 273-280. doi.org/10.1007/978-1-60761-702-0_16

Esfandiari E, Shokrpour M, Alavi-Kia S, 2010. Effect of Mg deficiency on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural Science*, 2:(3), 131-136. doi.org/10.5539/jas.v2n3p131

Gomathi V, Gnanamanickam SS, 2004. Polygalacturonase-inhibiting proteins in plant defence. *Current Science*, 87: (9), 1211-1217.

Gonzalez E, Sutton TB, Correl JC, 2006. Clarification of the etiology of Glomerella leaf spot and bitter rot of apple caused by *Colletotrichum* spp. based on morphology and genetic, molecular and pathogenicity tests. *Phytopathology*, 96:(1) 982-992. doi.org/10.1094/PHYTO-96-0982.

Guetsky R, Kobiler I, Wang X, Perlman N, Gollop N, Avila-Quezada G, Prusky D, 2005. Metabolism of the flavonoid epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on pathogenicity on avocado fruits. *Phytopathology*, 95:(11), 1341-1348. doi.org/10.1094/PHYTO-95-1341.

Gregori R, Mari M, Bertolini P, Barajas JS, Tian JB, Labavitch JM, 2008. Reduction of *Colletotrichum acutatum* infection by a polygalacturonase inhibitor protein extracted from apple.

Postharvest biology and technology, 48:(2), 309-313.
doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.10.006

Heller J, Tudzynski P, 2011. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. Annual review of phytopathology, 49, 369-390.
doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095355

Herbert C, O'Connell R, Gaulin E, Salesses V, Esquerré-Tugayé MT, Dumas B, 2004 Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. Fungal Genetics and Biology, 41:(2), 140-147. doi.org/10.1016/j.fgb.2003.09.008

Herrera MDV, Toro ME, de Figueroa LI, Vazquez, F, 2004. Extracellular hydrolytic enzymes produced by phytopathogenic fungi. In: Environmental Microbiology-Humana Press, 299-321.
doi.org/10.1385/1-59259-765-3:299

Iakimova, E. T., Michalczuk, L., & Woltering, E. J. (2005). Hypersensitive cell death in plants-its mechanisms and role in plant defence against pathogens. Journal of fruit and ornamental plant research, 13:(4), 135-158.

Kubicek CP, Starr TL, Glass N L, 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. Annual review of phytopathology, 52, 427-451. doi.org/10.1146/annurev-phyto-102313-045831

Lamb C, Dixon RA, 1997. The oxidative burst in plant disease resistance. Annual review of plant biology, 48: (1), 251-275.
doi.org/ 10.1146/annurev.arplant.48.1.251

Levin L, Ramos AM, Parisi M, Gally M, 2007. Screening of *Colletotrichum* (Ascomycota) isolates, causal agents of soybean anthracnose, for laccase production. Bulletin of the Botanical Society of Argentina, 42:(1) 71 - 77.

Liao CY, Chen MY, Chen YK, Wang TC, Sheu ZM, Kuo KC, Lee MH, 2012. Characterization of three *Colletotrichum*

acutatum isolates from *Capsicum* spp. European Journal of Plant Pathology, 133:(3), 599-608. doi.org/10.1007/s10658-011-9935-7

Lin SY, Okuda S, Ikeda K, Okuno T, Takano Y, 2012. LAC2 encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 25:(12), 1552-1561. doi.org/10.1094/MPMI-05-12-0131-R

Mittler R, Vanderauwera S, Suzuki N, Miller G, Tognetti VB, Vandepoele K, Van Breusegem F, 2011. ROS signaling: the new wave? Trends in plant science, 16:(6), 300-309. doi.org/10.1016/j.tplants.2011.03.007

Münch S, Lingner U, Floss DS, Ludwig N, Sauer N, Deising HB, 2008. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. Journal of plant physiology, 165: (1), 41-51. doi.org/10.1016/j.jplph.2007.06.008.

Nakano Y, Asada K, 1981. Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. Plant and cell physiology, 22:(5), 867-880.

O'Brien J, Daudi A, Butt VS, Bolwell G P. 2012. Reactive oxygen species and their role in plant defence and cell wall metabolism. Planta, 236:765–779. doi.org/ 10.1007/s00425-012-1696-9

Phoulivong S, McKenzie EHC, Hyde KD, 2012. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. Current Research in Environmental & Applied Mycology, 2, 99-111. doi.org/10.5943/cream/2/2/2

Prusky D, Alkan N, Mengiste T, Fluhr, R, 2013. Quiescent and necrotrophic lifestyle choice during postharvest disease development. Annual review of phytopathology, 51, 155-176. doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349

Ramos AM, Gally M, García MC, Levin L, 2010. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*, causal agent of

soybean anthracnose. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27:(4), 186-190. doi.org/10.1016/j.riam.2010.06.002

Reignault P, Valette-Collet O, Boccara M, 2008. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology*, 120:(1), 1-11. doi.org/10.1007/s10658-007-9184-y

Shetty NP, Kristensen BK, Newman MA, Møller K, Gregersen PL, Jørgensen HJL. 2003. Association of hydrogen peroxide with restriction of *Septoria tritici* in resistant wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 62, 333–346. doi.org/ 10.1016/S0885-5765(03)00079-1

Shih J, Wei Y, Goodwin PH, 2000. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, 243:(1), 139-150. doi.org/10.1016/S0378-1119(99)00546-6

Terry LA, Joyce DC, Adikaram NK, Khambay BP, 2004. Preformed antifungal compounds in strawberry fruit and flower tissues. *Postharvest Biology and Technology*, 31:(2), 201-212. doi.org/10.1016/j.postharvbio.2003.08.003

Tewari R, Tewari RP, Hoonda GS, 2004. Microbial pectinases. In: *Microbial enzymes and biotransformations (Methods in Biotechnology)*, Humana Press, 191-208.

Thordal-Christensen H, Zhang Z, Wei YD, Collinge DB, 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants - H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley powdery mildew interaction. *The Plant Journal*, 11:(6), 1187–1194. doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.11061187.x

Velho AC, Stadnik MJ, Casanova L, Mondino P, Alaniz S, 2014a. First report of *Colletotrichum karstii* causing Glomerella leaf spot on apple in Santa Catarina State, Brazil. *Plant Disease*, 98:(1), 157-157. doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0498-PDN

Velho AC, Stadnik MJ, Casanova L, Mondino P, Alaniz S, 2014b. First Report of *Colletotrichum nymphaeae* causing apple bitter rot in Southern Brazil. *Plant Disease*, 98:(4), 567-567. doi.org/10.1094/PDIS-06-13-0671-PDN

Velho AC, Alaniz S, Casanova L, Mondino P, Stadnik MJ, 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*, 119:(4), 229-244. doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.009

Wattad C, Freeman S, Dinoor A, Prusky D, 1995. A nonpathogenic mutant of *Colletotrichum magna* is deficient in extracellular secretion of pectate lyase. *Molecular plant-microbe interactions*, 8:(4), 621-626. doi.org/10.1094/MPMI-8-0621

Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen NT, Dinoor A, Pines O, Prusky D, 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14:(8), 988-995. doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.8.988

6. CONCLUSÕES GERAIS

O presente estudo possibilitou um maior conhecimento acerca da diversidade das espécies de *Colletotrichum* que afetam a macieira no Sul do Brasil e Uruguai.

Foram identificadas novas espécies causadoras de podridão amarga (PA) e mancha foliar de macieira (MFG) apesar do número limitado de isolados. Baseado na identificação molecular e nos estudos morfoculturais, no Brasil a maioria dos isolados, tanto da PA como da MFG foram identificados como da espécie *Colletotrichum fructicola*.

Além do *C. fructicola*, foi identificado pela primeira vez no Brasil a espécie *Colletotrichum nymphaeae* em frutos e o *Colletotrichum karstii* atacando folhas de macieira. No Uruguai, as espécies identificadas foram *C. fructicola*, *C. theobromicola* e *C. melonis*, todos afetando frutos.

Outro aspecto importante deste estudo é com relação à patogenicidade dos isolados. Estudos anteriores não demonstravam com clareza se os isolados causadores de MFG possuíam capacidade de causar PA e vice versa. Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram que muitos isolados são capazes de ocasionar ambas as doenças. No teste de patogenicidade em frutos, todos os isolados ocasionaram sintomas de PA, porém a maioria dos isolados brasileiros necessitaram de ferimentos para desencadear a podridão.

No Uruguai, a MFG não foi detectada até o momento nos pomares, todavia identificou-se um isolado de PA como potencial causador da MFG.

Em relação às enzimas extracelulares, a laccase e a pectina liase foram produzidas em maior quantidade no isolado causador de PA, o que demonstra uma maior importância dessas enzimas na infecção de frutos do que em folhas.

Várias diferenças foram observadas no comportamento das enzimas envolvidas no estresse oxidativo durante a infecção com isolados causadores de PA e MFG. O isolado de MFG induziu um aumento na atividade das enzimas GPOX, CAT e GR diferentemente do isolado causador de PA. O aumento na perda de eletrólitos 48 h após a inoculação permitiu identificar aproximadamente o período de transição do fungo da fase biotrófica para a necrotrófica.

O comportamento hemibiotrófico do *C. fructicola* demonstrou que a ativação das enzimas antioxidantes ocorre principalmente nas fases iniciais, todavia estas parecem não atuar como respostas de defesa da planta, mas sim como uma forma de suprimir essas respostas e favorecer a infecção.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; GONÇALVES, A.E.; STADNIK, M.J. Ulvan effect on conidial germination and appressoria formation of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytoparasitica*, v. 42, n. 5, p. 631-640, 2014.

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

BAILEY, J.A, JEGER, M.J. *Colletotrichum*. *Biology, Pathology and Control*. CABI, Wallingford, UK.388p, 1992.

BAKER, C.J.; ORLANDI, E.W. Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.33, p.299-321, 1995.

BALDRIAN, P. Fungal laccases—occurrence and properties. *FEMS microbiology reviews*, v. 30, n. 2, p. 215-242, 2006.

BARONCELLI, R. et al. First report of apple bitter rot caused by *Colletotrichum godetiae* in the United Kingdom. *Plant Disease*, v. 98, n. 7, p. 1000-1000, 2014.

BECKER, W.F., KATSURAYAMA, Y., BONETI, J.I.S. Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira. *Agropecuária Catarinense*, v.13, n.3, p.14-19, 2000a.

BECKER, W.F., KATSURAYAMA, Y., BONETI, J.I.S. Sistema de previsão da mancha foliar da gala em macieira. *Agropecuária Catarinense*, v. 17, n.3, p.64-67, 2004b.

BEGEROW, D., NILSSON, H., UNTERSEHER, M., MAIER, W. Current state and perspectives of fungal DNA barcoding and

rapid identification procedures. Applications in Microbiology and Biotechnology. v.87, p. 99–108, 2010.

BERNSTEIN, B., ZEHR E.I., DEAN, R.A., SAHABI, E. Characteristics of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. Plant Disease, v. 79, n. 5, p. 478-482, 1995.

BOLWELL, G.P; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence—a broad perspective. Physiological and Molecular Plant Pathology, v. 51, n. 6, p. 347-366, 1997.

BONETI, J.I.S; KATSURAYAMA, Y. Uso dos fosfitos e compostos naturais no controle das doenças da macieira. Encontro nacional sobre fruticultura de clima temperado, v. 12, p. 54-66, 2011.

BØRVE, J.; STENSVAND, A. *Colletotrichum acutatum* found on apple buds in Norway. Plant Health Progress, v. 10, p. 1094, 2007.

CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. Fungal Diversity, v. 39, n. 1, p. 183-204, 2009.

CANNON, P. F., DAMM, U., JOHNSTON, P.R, WEIR, B.S. *Colletotrichum*—current status and future directions. Studies in Mycology, v. 73, p. 181-213, 2012.

CERVONE, F. et al. The role of polygalacturonase, PGIP and pectin oligomers in fungal infection. Progress in Biotechnology, v. 14, p. 191-205, 1996.

CHI, M., PARK, S.Y., KIM, S., LEE, Y.H. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host. PLoS Pathog, v.5, n.4, p. e1000401, 2009.

COLLMER A, KEEN N. The role of the pectic enzymes in plant pathogenesis. Annual Review Phytopathology. v. 24, n.1, p.383–409, 1986.

CORNILLE, A., GLADIEUX, P., SMULDERS, M. J., ROLDÁN-RUIZ, I., LAURENS, F., LE CAM, B., GIRAUD, T. New insight into the history of domesticated apple: secondary contribution of the European wild apple to the genome of cultivated varieties. *PLoS Genetics*, v. 8, n. 5, p. e1002703, 2012.

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

DAMM, U.; CANNON, P.F.; WOUDEBERG, J.H.C.; JOHNSTON,P.R.; WEIR B.S.; TAN, Y.P.; SHIVAS, R.G.; E CROUS, P.W. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, v. 73, p.1–36, 2012.

DEAN, R. et al.The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, v.13, n.4, p.414–430, 2012.

DEISING, H.B.; WERNER, S.; WERNITZ, M. The role of fungal appressoria in plant infection. *Microbes and infection*, v. 2, n. 13, p. 1631-1641, 2000.

DENARDI, F.; BERTON, O.; SPENGLER, M.M. Resistência genética à podridão amarga em maçãs, determinada pela taxa de desenvolvimento da doença em frutos com e sem ferimentos. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 25, n. 3, 2003.

DU, M., SCHARDL, C.L., NUCKLES, E.M., VAILLANCOURT, L.J. Using mating-type gene sequences for improved phylogenetic resolution of *Collectotrichum* species complexes. *Mycologia*, v. 97, n. 3, p. 641-658, 2005.

EPAGRI, A cultura da macieira. Epagri: Florianópolis, 743 p. 2002.

ESFANDIARI, E.; SHOKRPOUR, M.; ALAVI-KIA, S. Effect of Mg deficiency on antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation. *Journal of Agricultural Science*, v. 2, n. 3, p. p.131, 2010.

FAOSTAT, Food and agriculture organization of the United Nations- Statistics Division. <http://faostat3.fao.org/home/E>, Acesso em Março 2015.

FREEMAN, S.; MINZ, D.; JURKEVITCH, E.; MAYMON, M.; SHABI, E. Molecular analyses of *Colletotrichum* species from almond and other fruits. *Biochemistry and Cell Biology*, v.90, n.6, p.608-614, 2000.

FURLAN, C.R.C; DANTAS, A.C M., DENARDI, F., BECKER, W. F., MANTOVANI, A. Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da Epagri à mancha foliar de *Glomerella* (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 32, p. 507-514, 2010.

GIARETTA, D.R., BOGO, A., COELHO, C.M.M., GUIDOLIN, A.F., DANTAS, A.C.M., GOMES, E.A. ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of apple glomerella leaf spot. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, p. 806-812, 2010.

GILL, S., TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, v.48, n.12, p.909-930, 2010.

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*, n.96, p.982-992, 2006.

GONZALEZ, E., SUTTON, T.B. First report of *Glomerella* leaf spot (*Glomerella cingulata*) of apple in the United States. *Plant Disease*. v. 83, n.11, p. 1074-1074, 1999.

GONZALEZ, E.; SUTTON, T.B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in North Carolina. *Plant disease*, v. 88, n. 12, p. 1335-1340, 2004.

GUETSKY, R., KOBILER, I., WANG, X., PERLMAN, N., GOLLOP, N., AVILA-QUEZADA, G., PRUSKY, D. Metabolism

of the flavonoid epicatechin by laccase of *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on pathogenicity on avocado fruits. *Phytopathology*, v. 95, n. 11, p. 1341-1348, 2005.

HAMADA, N. A Epidemiologia da mancha foliar de glomerella em macieira. Tese, Curitiba-PR, 117p., 2013.

HAMADA, N.A.; KATSURAYAMA, Y.; DANTAS, A.C.M. Sensibilidade “*in vitro*” ao benomyl por isolados de *Colletotrichum* spp. associados à mancha da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology*, v. 34, n. 5, p. 347-351, 2009

HELLER, J.; TUDZYNSKI, P.. Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. *Annual review of phytopathology*, v. 49, p. 369-390, 2011.

HUGHES, K.J.D.; LANE, C.R.; COOK, R.T.A. Development of a rapid method for the detection and identification of *Colletotrichum acutatum*. In: *Diagnosis and Identification of Plant Pathogens*. Springer Netherlands, 1997. p. 113-116.

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, n.1, p.147–182, 2009.

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

IDNURM, A., HOWLETT, B.J. Pathogenicity genes of phytopathogenic fungi. *Molecular Plant Pathology*, v.2, n.4, p.241–255, 2001.

IUCHI, V.L. Botânica e fisiologia. In: EPAGRI. A cultura da macieira. Florianópolis, p.59-102, 2002.

KATSURAYAMA, Y., BONETI, J.I.S. Manejo das doenças de verão da macieira no sul do Brasil In: STADNIK MJ (Ed.) *Manejo Integrado de Doenças da Macieira*. Florianópolis, CCA-UFSC, p. 45-64, 2009.

KOU, L.P., GASKINS, V., LUO, Y.G., JURICK, W.M. First report of *Colletotrichum fioriniae* causing postharvest decay on 'Nittany' apple fruit in the United States. *Plant Disease*, v. 98, n.7, 993-993, 2014.

KUBICEK, C.P.; STARR, T.L.; GLASS, N.L. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, v. 52, p. 427-451, 2014.

LAMB, C.; DIXON, R.A. The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual review of plant biology*, v. 48, n. 1, p. 251-275, 1997.

LEITE, R.P., TSUNETTA, M., KISHINO, A.Y. Ocorrência da mancha foliar de *Glomerella* em macieira no estado do Paraná. *Informe de pesquisa Iapar*. v. 81, 6p, 1988.

LEVIN, L., RAMOS, A.M., PARISI, M., GALLY, M. Screening of *Colletotrichum* (Ascomycota) isolates, causal agents of soybean anthracnose, for laccase production. *Bulletin of the Botanical Society of Argentina*, v. 42, n.1, 71 – 77, 2007.

LIN, S.Y., OKUDA, S., IKEDA, K., OKUNO, T., TAKANO, Y. LAC2 encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, v.25, n.12, 1552-1561, 2012.

MENDGEN, K.; DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens—a cytological and physiological evaluation. *New Phytologist*, v. 124, n. 2, p. 193-213, 1993.

MGAP-DIEA, Estadísticas agropecuárias-Encuesta fructícola de hoja caduca (Zafra 2013), Uruguay, 29p, 2013.

MITTLER, R. et al. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in plant science*, v. 9, n. 10, p. 490-498, 2004.

MITTLER, R., VANDERAUWERA, S., SUZUKI, N., MILLER, G., TOGNETTI, V.B., VANDEPOELE, K., VAN

BREUSEGEM, F. ROS signaling: the new wave? Trends in plant science, v.16, n.6, 300-309, 2011.

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.

O'CONNELL, R.J. 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.

O'CONNELL, R.J., PERFECT, S., HUGHES, B., CARZANIGA, R., BAILEY, J., & GREEN, J. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction of *Colletotrichum*. American Phytopathology Society Press, St Paul, 57-77, 2000.

PERES, N.A.; TIMMER, W.; ADASKAVEG, J.E.; CORRELL, J.C. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. Plant Disease, v.89, n. 8, p.784-796, 2005.

PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J.; GREEN, J.R. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. Fungal Genetics and Biology, v.27, n. 2, p.186-198, 1999.

PETRI, J.L. Fatores edafoclimáticos. In: A Cultura da Macieira. Florianópolis, 743p, 2002.

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

PRUSKY, D., FREEMAN, S., DICKMAN, M.B. *Colletotrichum*. Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. APS Press, St Paul, USA. 393p, 2000.

RAMOS, A.M., GALLY, M., GARCÍA, M.C., LEVIN, L. Pectinolytic enzyme production by *Colletotrichum truncatum*,

causal agent of soybean anthracnose. *Revista Iberoamericana de Micología*, v.27, n.4, p.186-190, 2010.

RATANACHERDCHAI, K. et al. ISSR for comparison of cross-inoculation potential of *Colletotrichum capsici* causing chilli anthracnose. *African Journal of Microbiology Research*, v.4, n.1, p. 76-83, 2010.

RESENDE, M., MACHADO, J. Manejo de doenças em pós-colheita de produtos vegetais. UFLA/FAEP, 182p. 2000.

ROSENBERGER, D. Glomerella Leaf Spot – a new disease affecting Golden Delicious apples in NY? Cornell University, Dept. of Plant Pathology. www.fruit.cornell.edu. Acesso em Setembro 2012.

SCHOCH, C.L, SEIFERT, K.A., HUHNDORF, S., ROBERT, V., SPOUGE, J.L., LEVESQUE, C.A., GRIFFITH, G.W. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 109, n. 16, p. 6241-6246, 2012.

SHANE, B. Lenticel infections and bitter rot of apples. Michigan State University Extension. http://msue.anr.msu.edu/news/lenticel_infections_and_bitter_rot_of_apples. Acesso em Setembro de 2012.

SHENOY, B.D.; JEEWON, R.; LAM, W.H.; BHAT, D.J.; THAN, P.P.; TAYLOR, P.W.J.; HYDE, K.D. Morpho-molecular characterisation and epitypification of *Colletotrichum capsici* (Glomerellaceae, Sordariomycetes), the causative agent of anthracnose in chilli. *Fungal Diversity*, v. 27, p.197–211, 2007.

SHETTY, N.P. et al. Roles of reactive oxygen species in interactions between plants and pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, v. 121, n. 3, p. 267-280, 2008.

SHI, Y., CORRELL, C., GUERBER, C., ROM, C.R. Frequency of *Colletotrichum* species causing bitter rot of apple in the southeastern United States. *Plant Disease*, v.80, n.6, p. 692-696, 1996.

SHIH, J.; WEI, Y.; GOODWIN, P.H. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, v. 243, n. 1, p. 139-150, 2000.

SHIVAS, R.G., TAN, Y.P. A taxonomic reassessment of *Colletotrichum acutatum*, introducing *C. fioriniae* comb. et stat. nov. and *C. simmondsii* sp. nov. *Fungal Diversity*, v. 39, p.111-122, 2009.

SREENIVASAPRASAD, S., BROWN, A.E., MILLS, P.R. DNA sequence variation and interrelationships among *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v.41, 265–2688, 1992.

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

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey JA, Jeger MJ, eds). CABI, Wallingford, UK, p 1-26, 1992.

SUTTON, T.B., VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.V. Necrotic leaf blotch of Golden delicious e *Glomerella* leaf spot: a resolution of common names. *Plant Disease* v.82, n. 3, p. 267-268, 1998.

TALAMINI, V, SOUZA, E.A., POZZA, E.A., SILVA, G.F., ISHIKAWA, F.H., CAMARGO. J.O.A. Genetic divergence among and within *Colletotrichum lindemuthianum* races assessed by RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, v.31, n.6, p.545-550, 2006.

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

TAYLOR, J.A. Necrotic Leaf Blotch and Fruit Rot of Apple Caused by a Strain of *Glomerella cingulata*. *Phytopathology* v.61, 221-224, 1971a.

THAUNG, M.M. *Coelomycete* systematics with special reference to *Colletotrichum*. *Mycoscience*, v. 49, n.6, p.345-350, 2008.

TORRES, M.A, DANGL, J.L. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Current Opinion in Plant Biology*, v.8, n.4, p. 397–403, 2005.

UREÑA-PADILLA, A.R., MACKENZIE S.J., BOWEN, B.W., LEGARD, D.E. Etiology and population genetics of *Colletotrichum* spp. causing crown and fruit rot of strawberry. *Phytopathology*, v.92, n.11, p. 1245-1252, 2002.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M. Características e controle de *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum gloeosporioides*), agente causal da mancha das folhas e frutos da macieira. *Circular Técnica, Embrapa Uva e Vinho*, n. 25, 16p, 1999.

VALDEBENITO-SANHUEZA, R.M.; BECKER, W.; BONETI, J.I.; KATSURAYAMA, Y.; CZERMAINSKI, A.B. Manejo das doenças de verão na produção integrada de maçã. *Bento Gonçalves: EMBRAPA*, n.36, 12p, 2002.

VALERO, M. et al. Benomyl sensitivity assays and species-specific PCR reactions highlight association of two *Colletotrichum gloeosporioides* types and *C. acutatum* with rumple disease on Primofiori lemons. *European journal of plant pathology*, v. 127, n. 3, p. 399-405, 2010.

VELASCO, R. et al. The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature genetics*, v. 42, n. 10, p. 833-839, 2010.

WANG B, LI BH, DONG XL, WANG CX, ZHANG ZF. Effects of temperature, wetness duration, and moisture on the conidial germination, infection, and disease incubation period of *Glomerella cingulata*. *Plant Disease*, v.99, n.2, 249-256. 2015.

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

WEIR, B., JOHNSTON, P.R., DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, v.73, p.115-180, 2012.

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

WHITE, T.J. et al. 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.

WHITELAW-WECKERT, M.A., CURTIN, S.J., HUANG, R., STEEL, C.C., BLANCHARD, C.L., ROFFEY, P.E. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology*, v. 56, n.3, p.448-63, 2007.

WIJESUNDERA, R.L.C. et al. Cell wall degrading enzymes of *Colletotrichum lindemuthianum*: their role in the development of bean anthracnose. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, v. 34, n. 5, p. 403-413, 1989.

ZHANG, N. et al. An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia*, v. 98, n. 6, p. 1076-1087, 2006.