UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS

UFAL

CECA

Livoney Barbosa de Oliveira Goes

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ORIUNDOS DE TOMATEIRO

Rio Largo
2013

LIVONEY BARBOSA DE OLIVEIRA GOES

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ORIUNDOS DE TOMATEIRO

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alagoas como parte das exigências do programa de Pós-Graduação em Proteção de Plantas, para obtenção do título de Mestre em Proteção de Plantas.

Orientador: Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior.

Rio Largo

2013

Catalogação na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Fabiana Camargo dos Santos

G598c Goes, Livoney Barbosa de Oliveira.
Caracterização de isolados de *Colletotrichum* spp. oriundos de tomateiro / Livoney Barbosa de Oliveira Goes. – 2013.
54 f. : il.

Orientador: Gildemberg Amorim Leal Júnior.
Dissertação (Mestrado em Proteção de plantas) – Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2013.

Bibliografia: f. 50-54.

1. MicroTom. 2. Antracnose. 3. Micro-tomateiro – Resistência. I. Título.

CDU: 632.931.1

LIVONEY BARBOSA DE OLIVEIRA GOES

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum* spp. ORIUNDOS DE TOMATEIRO

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Alagoas em 14 de Agosto do ano de 2013. Aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior - Universidade Federal de Alagoas (Orientador)

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Gaus Silvestre de Andrade Lima - Universidade Federal de Alagoas (Examinador)

Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro - Universidade Federal de Alagoas (Examinador)

Rio Largo

2013

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e à unidade acadêmica Centro de Ciências Agrárias (CECA) pela possibilidade de cursar a pós-graduação em Proteção de Plantas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos os Professores do Programa de Pós-graduação com os quais tive a oportunidade de aprender e amadurecer enquanto profissional durante todo o mestrado.

Aos colegas da Pós-Graduação pela tranquilidade, empenho e repartição de conhecimento durante a jornada árdua enfrentada nas disciplinas.

Ao Dr. Gildemberg Amorim Leal Júnior pela confiança, dedicação e paciência durante todo o desenvolvimento do presente trabalho.

Aos colegas da Clínica Fitossanitária CECA/UFAL e no Laboratório de Virologia Molecular pelo apoio, além dos dias divertidos e produtivos de sempre. Em especial ao Dr. Jean Herllington Araújo Monteiro pelas valorosas contribuições e ensinamentos.

Ao Laboratório de Melhoramento de Plantas CENA/USP pelo gentil acolhimento e treinamento. Em especial ao Dr. Eduardo de Andrade Bressan pelo tempo dedicado.

À Secretaria do curso de Pós-Graduação pelo profissionalismo e agilidade na resolução dos assuntos burocráticos durante os últimos dois anos.

A todos que contribuíram de alguma forma para esse resultado

Agradeço!

RESUMO

A quebra da resistência conferida por genes R e o surgimento de linhagens resistentes a fungicidas tem onerado e dificultado o controle de doenças fúngicas na agricultura. Assim uma resistência mais duradoura tem sido pesquisada e as bases das resistências do hospedeiro e do não-hospedeir*o* podem fornecer soluções para o problema. Muito dos processos base desses tipos de resistência ainda necessitam de investigação e interpretação, o que é promissor quando se empregam patossistemas envolvendo espécies modelos com facilidades para o uso de técnicas de genética reversa. O hospedeiro *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom é um excelente modelo vegetal para esse tipo de estudo, pois além de todas as vantagens exibidas por *Arabidopsis thaliana* é representativa agronomicamente. O patógeno *Colletotrichum* spp. além de ser responsável pela antracnose em muitas culturas tem sido intensivamente estudado e já são disponíveis ferramentas para genética reversa. Desse modo, objetivando propor o patossistema *Colletotrichum* sp. – MicroTom como modelo para estudos de resistências do hospedeiro e do não-hospedeiro. O presente estudo testou a interação de diferentes espécies de *Colletotrichum* contra *S. lycopersicum* cv. MicroTom e espécies distintas filogeneticamente pertencente aos grupos rosides (*Phaseolus lunatus*) e monocotiledôneas (*Musa* sp.). Inicialmente foi feita a identificação das espécies de *Colletotrichum* isoladas de tecidos doentes de *S. lycopersicum, P. lunatus* e *Musa* sp. por características morfoculturais. Depois foram pesquisadas diferenças no padrão eletroforético da amplificação da sequência ITS do rDNA. Os fatores enzimáticos de patogenicidade foram testados mediante infiltração em folhas de MicroTom com proteínas fúngicas secretadas em meio de cultivo líquido. A determinação de patógenos específicos ao tomateiro e não patógenos foi realizada com inoculação de estruturas fúngicas sobre folhas *de* MicroTom, *P. lunatus* e *Musa* sp. Os resultados sugerem que o isolados de *C. gloeosporioides* (1 e 2), *C. truncatum* e *C. musae* analisados são promissores para estudos das resistências do hospedeiro e do não-hospedeiro com MicroTom sob diferentes abordagens. Visto que os referidos isolados comportaram-se de maneira contrastante nos testes realizados, principalmente nos de patogenicidade os quais revelaram a adaptação de cada isolado a Solanaceae, Fabaceae e Musaceae respectivamente No entanto são necessários estudo detalhados de microscopia, e expressão gênica para melhor caracterização esses tipos de resistência exibida pelo MicroTom aos patógenos citados.

Palavras-chave: MicroTom. Antracnose. Resistência.

ABSTRACT

The breaking of the resistance conferred by R genes and the emergence of strains resistant to fungicides has impaired the control of fungal diseases in agriculture. Therefore a more durable resistance is been searched, the bases of host and non-host resistence may provide solutions to this problem. Much of the basic processes of these resistence still need further research and interpretation, which is promising when employing fungal and plant models with has facilities for the use of reverse genetic techniques. *Solanum lycopersicum* cv. MicroTom is an excellent model for this study, because it is a representative crop in addition to exhibit the same advantages of *Arabidopsis thaliana*. *Colletotrichum*, responsible for anthracnose in many cultures, has been extensively studied and has already developed tools for reverse genetic. Thus, in order to propose the pathosystem *Colletotrichum* spp. - MicroTom as a model for studies of host and non-host resistance. This study tested the interaction of different species of *Colletotrichum* against MicroTom, *Phaseolus lunatus* and *Musa* sp. representing asteroids, rosides and monocots. First the fungal morphological characterization it was supported by rDNA sequence analyses. Enzymatic factors of pathogenicity were tested by infiltrating MicroTom`s leaves with fungal proteins secreted in liquid medium. The pathogenicity test was described by inoculation with fungal structures on *S. lycopersicum*, *P. lunatus* and *Musa sp*. The results suggest that *C. gloeosporioides* cultures 1 and 2, *C. truncatum* and *C. musae* constitute along with MicroTom excellent pathosystems for studying host and non-host resistance under different approaches. Because these isolates showed a contrasting features in the pathogenicity tests, which revealed the adaptation to Solanaceae Fabaceae and Musaceae. However detailed studies of microscopy and gene expression are needed to better characterize these types of resistance exhibited.

Keywords: MicroTom. Anthracnose. Resistence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Resumo de estratégias de infecção empregadas por algumas espécies de *Colletotrichum*.	**17**
Figura 2 –	Comportamento do isolado CF15 frente a diferentes meios de cultivo. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente no teste de Tukey ($p < 0.05$). **A** – Taxa de crescimento micelial em sete dias (dms = 0,39 CV% = 1,45). **B** - Produção média de conídios no décimo dia (dms = 1,6 CV% = 12,89).	**27**
Figura 3 -	Colônias de *Colletotrichum* spp. aos 10 dias de crescimento sobre BDA a 25ºC e 12h de luz. **A** – CF13 - *C. gloeosporioides* (*C.g.1*), **B** – CF15- *C. coccodes* (*C.c.*), **C** – CF16, **D** – CF17- *C. gloeosporioides* (*C.g.2*), **E** – JL- *C. acutatum* (*C.a.*), **F** – *C. truncatum* (*C.t.*), **G** – *C. musae* (*C.m.*).	**29**
Figura 4 -	Conídios e apressórios de *Colletotrichum* x400. **A** e **B** – *C.c*, **C** e **D** – *C.a.*, **E** e **F** – *C.m.*	**30**
Figura 5 –	Quadro-resumo das características analisadas para identificar morfometricamente os isolados de *Colletotrichum*.	**31**
Figura 6 –	DNA genômico submetido a duas horas de eletroforese 3V*cm-1 em gel de agarose 0,8%.	**33**
Figura 7 –	Produto de PCR visualizado após duas horas de eletroforese 3V*cm-1 em gel de agrose 1,5%. Utilizou-se a combinação de iniciadores ITS 3 e 4 para *C.g.1* e *C.g.2* e ITS 1 e 4 para os demais. A direita amplificação realizada somente *C.c*, visto a ausência de amplificação na primeira PCR.	**33**
Figura 8 -	Folhas de Micro-Tom infiltradas com meio de cultivo líquido onde cresceram *Colletotrichum* spp.. **A** – ADE. **B** – BDA+*C.g.2*, **C** – YCBnp10+*C.c.*).	**35**
Figura 9 -	Folhas Micro-Tom após 168 h da inoculação com discos de BDA contendo micélio. **A**- testemunha, **B** – *C.c.*, **C** – CF16, **D** – *C.g.2*, **E** – *C.a.*, **F** – C.t..	**38**
Figura 10 -	Frutos de tomateiro inoculados com discos de BDA contendo micélio. **A** – testemunha, **B** – *C.g.1*, **C** – *C.c.*, **D** – CF16, **E** – *C.g.2*, **F** – *C.a.*, **G** – *C.t.*, **H** – *C.m.*.	**39**
Figura 11 -.	Teste de patogenicidade sobre folhas (A) e frutos (B) destacados de tomateiro. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente no teste de Tukey ($p < 0.05$). **A** – dms = 2,53 CV% = 14,95. **B** – dms = 5,63 CV% = 26,58	**40**
Figura 12 –.	Patogenicidade a folhas de fava inoculados com discos de BDA contendo micélio. **A** – testemunha, **B** – *C.g.1*, **C** – *C.c.*, **D** – CF16, **E** – *C.g.2*, **F** – *C.a.*, **G** – *C.t.*, **H** – *C.m.*.	**42**
Figura 13 -	Patogenicidade a frutos de bananeira inoculados com discos de BDA contendo micélio. **A** – testemunha, **B** – *C.g.1*, **C** – *C.c.*, **D** – CF16, **E** – *C.g.2*, **F** – *C.a.*, **G** – *C.t.*, **H** – *C.m.*.	**43**
Figura 14 –	Patogenicidade a folhas de *Phaseolus lunatus* e frutos de *Musa* sp. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente no teste de Tukey ($p < 0.05$). **A** - dms = 3,5 CV% = 15,28. **B** - dms = 1,04 CV% = 33,63.	**44**
Figura 15 –	Quadro-resumo da caracterização multifásica empregada para as espécies de *Colletotrichum* spp.	**47**

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	**9**
2	**REVISÃO DE LITERATURA**	**11**
2.1	**Resistência do não-hospedeiro**	**11**
2.2	**MicroTom como planta modelo**	**13**
2.3	***Colletotrichum* spp. como microrganismo modelo**	**15**
3	**MATERIAL E MÉTODO**	**19**
3.1	**Obtenção de isolados adaptados e não-adaptados a MicroTom**	**19**
3.2	**Produção de plantas MicroTom**	**20**
3.3	**Produção otimizada de conídios**	**20**
3.4	**Identificação de isolados de *Colletotrichum***	**21**
3.4.1	Morfocultural	**21**
3.4.2	Molecular rDNA (ITS)	**21**
3.5	**Caracterização dos isolados de *Colletotrichum***	**22**
3.5.1	Teste de infiltração	**22**
3.5.2	Teste de patogenicidade	**23**
3.5.3	Avaliação da resistência	**24**
4	**RESULTADOS E DISCUSSÃO**	**25**
4.1	**Obtenção de isolados adaptados e não-adaptados a MicroTom**	**25**
4.2	**Produção otimizada de conídios**	**25**
4.3	**Identificação de isolados de *Colletotrichum***	**27**
4.3.1	Morfocultural	**27**
4.3.2	Molecular rDNA (ITS)	**32**
4.4	**Caracterização dos isolados de *Colletotrichum***	**34**
4.4.1	Teste de infiltração	**34**
4.4.2	Teste de patogenicidade	**36**
4.4.3	Avaliação da resistência	**40**
5	**CONSIDERAÇÕES FINAIS**	**45**
6	**CONCLUSÃO**	**49**
	REFERÊNCIAS	**50**

1 INTRODUÇÃO

A íntima relação entre plantas e patógenos levou à co-evolução de complexas estratégias para ataque e defesa (EL OIRDI, 2011). O alto nível de complexidade da resposta das plantas ao ambiente biótico é o produto da co-evolução entre elas e seus agressores (PIETERSE; DICKE, 2007). No processo, os patógenos adquiriram vários fatores de virulência, incluindo proteínas efetoras que bloqueiam a resistência basal da planta (resistência do não-hospedeiro –NHR), as plantas por sua vez desenvolveram uma segunda linha de defesa relacionada com os genes de resistência (BORGES, 2012). Os mecanismos de resistência vegetal a patógenos adaptados são bem compreendidos e estudados. O papel das moléculas efetoras e dos padrões moleculares associados a patógenos (padrões moleculares associados a patógenos - PAMPs) já está bem documentado para muitas espécies, como também os seus receptores específicos, e os genes de resistência vegetal (JONES; DANGL 2006).

Entretanto, a interação entre plantas e patógenos não-adaptados (NHR) é pouco definida (FAN; DOERNER 2012). Essa predileção e quantidade maior de estudos sobre interações compatíveis podem ser explicada, em parte, pois a resistência qualitativa é facilmente observada nos hospedeiros, são distinguíveis dois fenótipos: resistente e suscetível seguindo a herança mendeliana (FEYS; PARKER 2000; GLAZEBROOK 2001; HULBERT et al., 2001). É a resistência mediada por genes R. Em contraste a resistência quantitativa é caracterizada por um contínuo no fenótipo que vai desde a alta suscetibilidade à alta resistência, graças às recombinações dentro da progênie. Tal resistência é controlada por mais que um gene e pode ser fortemente influenciada por fatores ambientais (PAJEROWSKA et al., 2005).

A NHR geralmente não apresenta sinais visuais quando manifestada, e está associada a mecanismos pré-formados e com produção de compostos secundários, e em alguns casos, é possível ocorrer resposta de hipersensibilidade (LIPKA et al., 2008). A resistência do não-hospedeiro envolve reconhecimento parcial dos microrganismos não-patogênicos que ativam mecanismos de proteção similares aos ativados por estresses abióticos ou bióticos (REIGNAULT; SANCHOLLE 2005). Os modelos atuais sugerem que as barreiras de defesa existem para prevenir a colonização de patógenos não-adaptados em plantas não-hospedeiras e vão desde as defesas pré-formadas físicas e químicas até a ativação da defesa após o reconhecimento do patógeno (FAN; DOERNER, 2012). Essas defesas iniciais desencadeiam na planta a NHR ou imunidade inata como também é conhecida.

Devido às particularidades desse tipo de defesa, tem sido alvo na busca por uma resistência mais duradoura alternativa a já empregada resistência do tipo gene-a-gene. As espécies de *Colletotrichum* têm sido usadas nesses estudos contra hospedeiros não representativos para as espécies agrícolas. Disso emerge a proposição de *S. lycopersicum* cv. MicroTom como planta modelo para estudos de interação e resistência do não-hospedeiro.

A cultivar adéqua-se a proposta por apresentar protocolos adaptados para estudo da genética reversa e possui uma gama de mutantes correlatos com os da planta modelo *A. thaliana*, e enquadrar-se como planta de interesse comercial. O sistema Micro-Tom e *Colletotrichum* é promissor devido ao fungo empregar diferentes estratégias nutricionais e ser patogênico a vários órgãos vegetais em diferentes fases fenológicas, sendo um patógeno de interesse econômico para a cultura. O sistema por adotar dois organismos modelos permite manipulações em ambos os organismos para o estudo da resistência não específica.

O tomate é e continuará sendo um dos mais populares vegetais do mundo mesmo com perdas agrícolas e redução na produtividade ocasionada por doenças. O melhoramento de plantas moderno tem produzido cultivares novas resistentes a doenças, no entanto, a emergência de novas raças de patógenos em um curto espaço de tempo muitas vezes quebra a resistência em um curto período. Uma variedade de fungicidas efetivos contra doenças do tomateiro foi desenvolvida, mas a ocorrência de linhagens resistentes a fungicidas acaba por anula-la. Assim entra-se num ciclo de desenvolvimento de cultivares com resistência específica *versus* novas raças virulentas ou, novos fungicidas *versus* linhagens resistentes. Isso sugere que as interações tomate-patógeno ainda necessitam de investigação detalhada dos mecanismos que conferem uma resistência ampla e duradoura. Os resultados podem ter relevância genérica para as interações planta-patógeno (ARIE et al., 2007)

Pelo exposto, o presente trabalho pretende caracterizar o sistema *Solanum lycopersicum versus Colletotrichum* spp. como modelo para o estudo da resistência do não-hospedeiro.

2 REVISÃO BIBLIOGÁFICA

2.1 Resistência do não-hospedeiro

As interações planta-patógeno podem ser explicadas por dois momentos evolucionariamente associados. O primeiro inclui interações entre os mecanismos constitutivos gerais de defesa vegetal e fatores de virulência produzidos pelo patógeno. No segundo a planta desenvolve a resistência adquirida depois do reconhecimento inicial do patógeno.

Quando não adaptado à patogênese determinado microrganismo não é efetivo em superar as defesas físicas e químicas inatas do vegetal, logo está configurada uma interação de não-hospedeiro. Essas defesas podem ser divididas entre aquelas presentes antes da interação com o microrganismo e aquelas formadas depois desse evento, são as chamadas defesas pré e pós-formadas, respectivamente.

As defesas pré-formadas incluem todas aquelas que, passivamente, impedem ou atrasam o acesso do microrganismo aos tecidos vegetais. Por outro lado as defesas pós-formadas resultam numa continuidade da defesa inicial após o acesso do microrganismo ao interior vegetal, esta já ativa e com a participação de genes envolvidos na defesa mediada por ácido salicílico (*salicilic acid* - SA; FAN; DOERNER, 2012) e outros hormônios vegetais como o ácido jasmônico (*jasmonic acid* - JA) e o etileno (*etilene* - ET).

Compostos de origem microbiana, bem como originados da degradação inicial dos tecidos vegetais são reconhecidos pela planta desencadeando a resposta imune primária. Os perfis ou padrões moleculares conservados (*Microbial* ou *Pathogen-Associated Molecular Patterns*; MAMPs ou PAMPs) presentes nos microrganismos, são reconhecidos por receptores de superfície do tipo LRR (*Leucine Rich Repeat*) associados a domínios quinase, responsáveis pelo desencadeamento de fosforilações promotoras de resposta em cascata (JONES; DANGL, 2006; NÜRNBERGER; KEMMERLING, 2006).

Os receptores do tipo LRR possuem um envolvimento crítico na resposta de resistência do não-hospedeiro. Esses receptores são também chamados de Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRRs), e não pertencem as classes dos genes de resistência envolvidos com a resposta HR (NUMBERGER et al., 2004).

A resposta inicial desencadeada (*PAMP-Triggered Immunity*-PTI) pode ser bloqueada em parte ou inteiramente por efetores produzidos pelos patógenos (*Effector-Triggered Susceptibility*-ETS), estes efetores quando reconhecidos por receptores associados aos genes de resistência geram uma segunda resposta (*Effector-Triggered Immunity*-ETI), a de hipersensibilidade ou HR (JONES; DANGL, 2006). Essa segunda forma de resistência

(genes *R*) do modelo "gene-a-gene" evoluiu possivelmente devido às defesas basais serem insuficientes em cultivares suscetíveis para evitar os efeitos danosos dos efetores patogênicos (JONES; DANGL, 2006; NÜRNBERGER; KEMMERLING, 2006).

Os patógenos desenvolveram inúmeras estratégias para suprimir ou burlar a resposta de defesa vegetal ou ainda induzir a suscetibilidade no hospedeiro, empregando mecanismos baseados em agentes específicos de características bioquímicas diversas para escapar do reconhecimento. Usualmente eliciadores, tais como carboidratos, glicoproteínas, proteínas, peptídeos, e toxinas produzidas pelo patógeno são reconhecidos por receptores comumente situados na membrana plasmática (WOLPERT et al., 2002; SHIRAISHI et al., 1997).

Após o reconhecimento desses eliciadores o vegetal ou ativa os mecanismos da resistência sistêmica adquirida (RSA) pelo incremento nos níveis de ácido salicílico (AS) e proteínas relacionadas à patogênese (proteínas-RP) contra patógenos necrotróficos (BOSTOCK et al., 2001; AGRIOS, 2005) ou ativa a resistência sistêmica induzida (RSI) via ácido jasmônico (JA) e etileno (ET) como sinal molecular (van LOON et al., 1998; SIDDIQUI; SHAUKAT, 2004).

O caráter multiestratificado da resistência não especifica determinado pelas camadas de mecanismos de proteção constitutivos e induzíveis tem sido alvo na busca de resistência mais duradoura e de amplo espectro contrapondo os resultados já obtidos com a resistência específica do tipo gene-a-gene. Os patógenos abordados são principalmente fungos bitróficos como, por exemplo, as diferentes espécies causadoras de ferrugens e míldios. No entanto os estudos têm sido estendidos para fungos necrotróficos e hemibitróficos. Entre os candidatos a fungos hemibiotroficos temos as espécies de *Colletotrichum*.

Uma vez que alguns espécimes desse gênero fúngico já tiveram seu genoma sequenciado, aliado à variedade de estilo de vida que vai desde a hemibiotrofia intracelular a necrotrofia subcuticular tornam esses fungos candidatos a modelo biológico. *Colletotrichum* já tem sido utilizado no estudo de NHR com *Medicago truncatula* (JAULNEAU et al., 2010) uma leguminosa proposta como modelo para estudo de interação com rizóbio, isso porque se dispõe de ferramentas biotecnológicas desenvolvidas para o estudo da genética reversa.

Comumente os estudos com os patógenos biotróficos tem utilizado a planta modelo *Arabidopsis thaliana* e outras de interesse agronômico como trigo, arroz, café, *Vicia fabae*. Os estudos apresentam uma diversidade de espécies abordadas e devido ao caráter multiestratificado e gênico do fenômeno é necessário um sistema microrganismo-planta que apresente vantagens no uso de ferramentas para estudo da resistência e que os resultados abranjam o contexto das espécies cultivadas.

A transição tem sido feita para espécies de Bracicaceae por aproveitar as facilidades do modelo *A. thaliana* e contrapor o fato daquele modelo não apresentar pontos positivos para representar plantas cultivadas. As pesquisas com gramíneas encontram na planta modelo *Brachypodium* respaldo para o estudo da resistência em gramíneas. No entanto falta um modelo para as planta dicotiledôneas podemos citar *Medicago truncatula* para as leguminosas do grupos das asterides faltando um representante para o grupo das rosides, logo podemos propor *Solanum lycopresicum* cv. Micro Tom.

2.2 MicroTom como planta modelo

Arabidopsis thaliana e *Lotus corniculatus* são excelentes modelos vegetais para pesquisas de base devido ao genoma conhecido e relativamente pequeno, bem como à passividade de manipulação genética pela inserção de tDNA (*transcript* DNA, ARIE et al., 2007; ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE, 2000). O uso de mutantes desse tipo em pesquisas contribuiu consideravelmente para avanços do entendimento das interações planta-patógeno (KUNKEL; BROOKS, 2002; GLAZEBROOK, 2001; ARIE et al., 2007). No entanto, *A. thaliana* possui limitações para o estudo de alguns aspectos dessa interação. Como por exemplo, o fruto tipo vagem não a torna um modelo ideal para estudar patógenos de frutos carnosos. Muitos insetos e microrganismos usados em conjunção com *Arabidopsis* tem limitada relevância sob condições de campo (HARVEY et al., 2007). Por exemplo, os Ascomicetos, que incluem os patógenos fúngicos predominantes nas lavouras, não são bem representados dentre os patógenos conhecidos de *Arabidopsis* (ARIE et al., 2007). Alguns sintomas e perdas no rendimento, observados em espécie cultiváveis, não são observados em *A. thaliana*. Logo outros modelos vegetais para estudos de interação planta-patógeno são necessários (TAKAHASHI et al., 2005; ARIE et al., 2007).

O repolho chinês (*Brassica napa* ou *B. campestres*) tem sido usado como alternativa a *Arabidopsis* por ser da mesma família botânica. Porém o cultivo do repolho chinês é restrito aos países do Leste Asiático, portanto tem valor limitado como modelo genérico (ARIE et al., 2007). Espécies vegetais não-brassicácea, tais como *Nicotiana attenuata*, e *Solanum nigrum* tem constituído excelentes modelos em estudos ecológicos da defesa vegetal em nível molecular, incluso com o desenvolvimento de ferramentas moleculares e possibilidade de ensaios em outras condições que não somente as da bancada do laboratório (KESSLER et al., 2004; BALDWIN et al., 2006; SCHMIDT et al., 2004). *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom é um bom modelo vegetal representante de *Solanaceae* e outras famílias botânicas com frutos carnosos tipo baga (SCOTT; HARBAUGH, 1989).

Essa cultivar anã de tomate produz frutos maduros em aproximadamente dois meses após a semeadura e é facilmente transformado com genes exógenos usando um sistema de transformação mediado por *Agrobacterium* (MEISSNER et al., 1997). *Enhancer trapping*, *gene trapping*, e sistemas de desligamento gênico baseados nos elementos tranponíveis *Ac*/*Ds* e tDNA são descritos para Micro-Tom (MEISSNER et al., 1997). Já são conhecidos mutantes hormonais da cultivar Micro-Tom, são eles: *brt* (pouco sensível a citocinina); *dgt* (pouco sensível a auxina); *not* (deficiente em ABA); *epi* (super produtor de etileno); *Nr* (insensível a etileno); *procera* (hipersensível a giberelina); *gib3* (deficiente em giberelina); *jai-1* (pouco sensível a jasmonato).

Micro-Tom responde a uma ampla gama de patógenos fúngicos tanto quanto cultivares comerciais de tomate. Takahashi et al. (2005) testando suscetibilidade de Micro-Tom a dezesseis patógenos bem conhecidos, observou que dez deles foram patogênicos a Micro-Tom. No entanto não foram experimentadas respostas diferenciais de espécies fúngicas intra-gênero sobre o modelo vegetal.

O modelo satisfaz os interesses científicos e agronômicos pelo fato de que tomateiro é um dos vegetais mais populares do mundo e é bem caracterizado geneticamente (EMMANUEL; LEVY, 2002).

No século XVI o tomate foi levado à Europa pelos exploradores espanhóis e depois o melhoramento levou ao tomate atualmente cultivado (ARIE et al., 2007). O Brasil é o oitavo maior produtor de tomate do mundo, tendo este comódite rendido 1,6 trilhões de dólares em 2011 (FAO, 2011). No entanto, seu cultivo mundial sofre com a abundância de doenças causadas por diversos microrganismos são cerca de 60 doenças e mais de 110 espécies de patógenos descritos (JONES et al., 1991). De acordo com The Phytopathological Society of Japan (2000) naquele país, 41 fungos, 10 bactérias, 1 fitoplasma, 15 viroses, e 14 nematoides são relatados como patógenos de tomate, muitos dos quais estão largamente distribuídos pelo mundo. Lopes e Ávila (2005) elencaram quinze doenças fúngicas, sete bacterioses e sete viroses afetando a produção de tomate no Brasil.

A maioria das espécies selvagens é usada como fonte de genes de resistência no melhoramento moderno de tomate, pois são relativamente resistentes contra doenças (ARIE et al., 2007). O *L. peruvianum* e *L. chilense* coletadas no Chile são atualmente resistentes ao míldio e *Alternaria alternata* (OKABE et al., 2005). Muitas das características de resistência a doenças, carregadas por muitas cultivares de tomate, foram introduzidas a partir de espécies selvagens em cruzamento com *S. lycopersicum* (AIRES et al., 2007).

As características morfológicas, representatividade entre as plantas cultivadas, disponibilidade de ferramentas desenvolvidas para estudos de genética reversa e a resposta a uma ampla gama de patógenos tornam Micro-Tom um excelente modelo para estudos em NHR.

Takahashi et al. (2005) testando suscetibilidade de Micro-Tom a dezesseis patógenos bem conhecidos, observou que dez dos microrganismos causaram doença. Neste e em outros estudos não foram avaliado espécies do gênero *Colletotrichum.*

2.3 *Colletotrichum* spp. como microrganismo modelo

O gênero *Colletotrichum* é um grande grupo dentro dos Ascomicetos, contem muitas espécies que causam antracnose em uma gama de culturas e plantas ornamentais (BAILEY; JEGER, 1992). Os sintomas são visíveis desde plântulas à planta adulta acometendo ramos, folhas, inflorescências e frutos, é doença mais severa em regiões tropicais e subtropicais (MENEZES, 2006).

As espécies de *Colletotrichum* infectam seus hospedeiros usando estratégias similares, as quais iniciam com a deposição e o reconhecimento dos conídios sobre a superfície do hospedeiro. Logo após a germinação dos conídios há a formação de estruturas especializadas na infecção incluindo tubo germinativo, apressório melanizado, hifa primária intracelular, e hifa secundária necrotrófica (LIAO et al., 2012; BHADAURIA et al., 2011; BAILEY; JEGER, 1992). Por muitos anos espécies desse gênero são utilizadas em estudos de interação fungo-planta, pois consistem em excelentes modelos para estudar as bases da patogenicidade (PERFECT et al., 1999; BAILEY; JEGER, 1992).

O gênero *Colletotrichum* apresenta plasticidade na forma de obter nutrientes do hospedeiro durante a colonização, nos estágios iniciais da infecção geralmente comporta-se com biotrófico, obtendo nutrientes das células vivas do hospedeiro, e nas fases tardias da doença nutre-se necrotroficamente, assimilando nutrientes depois de ter matado a célula hospedeira (BHADAURIA et al., 2011). Por isso são citados como fungos hemibiotróficos, existem relatos do comportamento endofítico não patogênico para algumas espécies do gênero (LU et al., 2004; PHOTITA et al., 2005; PROMPUTTHA et al., 2007)

Algumas espécies estão comumente associadas a determinados hospedeiros, por exemplo, *C. lindemuthianum* a leguminosas, principalmente a feijão comum (*Phaseolus vulgaris*), *C. musae*, a frutos de bananeira (*Musa* spp.). Por outro lado *C. gloeosporioides* e *C. acutatum*, podem ocorrer em diferentes famílias de hospedeiros (MENEZES, 2006).

O gênero *Colletotrichum* Corda (Teleomorfo: *Glomerella* Stonem.) é caracterizado por frutificações setosas, denominadas acérvulos, nas quais conídios hialinos são produzidos em massa alaranjada ou creme. Também podem ser formadas em ramificações laterais do micélio (MENEZES, 2006). Os conídios produzidos nos acérvulos estão envolvidos por uma matriz gelatinosa constituída de polissacarídeos e proteínas solúveis em água. Essa matriz, provavelmente, protege os conídios da dissecação, aumentando a eficiência de germinação e penetração no tecido hospedeiro. (MENEZES, 2006).

A germinação dos conídios ocorre somente na presença de água livre ou em elevada umidade relativa (>90%). Na extremidade do tubo germinativo do conídio há formação de um apressório, estrutura que pode também ser produzida na extremidade de hifas (MENEZES, 2006). No processo de infecção, o apressório adere à superfície do hospedeiro e por meio do acúmulo de glicerol desenvolve uma pressão de turgor que o permite penetrar a camada cuticular do hospedeiro com um fino peg de penetração ou infiltração e iniciar a colonização dos tecidos vegetais (PERFECT et al., 1999; MENEZES, 2006) inicialmente com a diferenciação do peg de penetração em uma hifa globulosa e biotrófica (BHADAURIA et al., 2011), em *C. truncatum* está hifa primária permanece contida na primeira célula epidérmica infectada durante toda a fase biotrófica (O'CONNELL et al., 1993).

Após a fase biotrófica o fungo muda para a fase necrotrófica que está associada com a produção de uma fina hifa secundária que ramifica-se intra e inter-celularmente, matando e decompondo os tecidos hospedeiro sendo esta mudança crítica no desenvolvimento da doença (BHADAURIA et al., 2011).

A maioria das espécies de *Colletotrichum* exibe a estratégia de infecção hemibiotrófica bifásica, embora a duração da fase biotrófica seja variável e esteja ausente em muitas interações. Isto é exemplificado pelo processo de infecção de *C. lindemuthianum* em feijão (*Phaseolus vulgaris*) depois da penetração as hifas fúngicas crescem no lumem celular sem penetrar no protoplasto do hospedeiro, ou seja, elas crescem entre as membranas plasmáticas e as paredes celulares (BAILEY; JEGER, 1992).

Figura 1 – Resumo de estratégias de infecção empregadas por algumas espécies de *Colletotrichum*

Espécie de *Colletotrichum*	**Planta hospedeira**
Patógenos hemibiotróficos	
C. lindemuthianum	*Phaseolus vulgaris*
C. graminicola	*Zea mays*
C. trucathum	*Pisum sativum*
C. gloeosporioides	*Medicago sativa*
	Stylosanthes guianenses
	Stylosanthes scabra
C. orbiculare	*Cucumis sativus*
C. destructivum	*Vigna unguiculata*
C. trifolii	*Medicago sativa*
C. sublineolum	*Sorghum bicolor*
Patógenos necrotróficos	
C. capsici	*Gossypium hirsutum*
	Vigna unguiculata
C. circinans	*Allium cepa*
C musae	*Musa spp*
C. gloeosporioides	*Carica papaya*
	Muscadinia rotundifolia
	Persea americana
Patógenos com ambas as estratégias de infecção	
C. gloeosporioides	*Citrus* spp.
	Stylosanthes spp.

Fonte: PERFECT et al. (1999)

.

Depois de colonizar uma ou mais células hospedeiras, a HI, que é biotrófica, subsequentemente dá origem às hifas necrotróficas (LATUNDE-DADA et al., 1996). Em muitas interações com *Colletotrichum* ainda não se sabe se ocorre uma fase biotrófica (PERFECT et al., 1999).

Devido a características de infecção algumas espécies de *Colletotrichum* estão comumente associadas a determinados hospedeiros (MENEZES, 2006). Ainda assim plantas que não são considerados hospedeiras de *C. acutatum* podem servir como uma fonte de inóculo potencial para a infecção de morango e permitir a sobrevivência do patógeno entre estações (FREEMAN et al., 2001). Neste sentido, é importante dizer que uma simples espécie pode causar doença em vários hospedeiros, como também, um único hospedeiro pode ser

atacado por várias espécies de *Colletotrichum*, as quais induzem sintomas semelhantes aos da antracnose (MENEZES, 2006).

Disso depreende-se a importância da correta identificação da espécie associada a doença naquele hospedeiro. A identificação da espécie de *Colletotrichum* é realizada por aspectos da cultura e características morfológicas e dimensões dos conídios e apressórios. Estes poucos caracteres analisados para separar espécies e subespécies podem ser imprecisos para tal (CAI et al., 2011; KO KO et al., 2011) devido a grande plasticidade dessas características frente a variações ambientais (PHOTITA et al., 2005).

Nas últimas duas décadas várias técnicas têm sido sugeridas como ferramentas auxiliares à taxonomia morfológica de fungos. A saber, o uso de marcadores moleculares principalmente DNA (WILLIAMS et al., 1990) além de padrões eletroforéticos de proteínas e isoenzimas (PATERSON; BRIDGE, 1994). A identificação da espécie somente com base morfológica, torna–se um tanto difícil devido à variabilidade na expressão dos caracteres adotados, exigindo, portanto, a aplicação conjunta de outros métodos que possibilitem uma diferenciação correta entre espécies (MENEZES, 2006), vários autores tem feito progressos usando essa abordagem multifásica para a identificação de espécies de *Colletotrichum* (WEIR; JOHNSTON 2010; WIKEE et al., 2011; YANG et al., 2011).

3 MATERIAL E METODOS

3.1 Obtenção de isolados adaptados e não-adaptados a MicroTom

Objetivando reunir uma coleção de isolados fúngicos candidatos a patógenos adaptados a *S. lycopersicum*, realizou-se o isolamento direto e indireto a partir dos tecidos de folhas de tomateiro *S. lycopersicum* e frutos de jiloeiro (*S. gilo*) com sintomas típicos de antracnose. Tais tecidos foram obtidos, respectivamente, de plantas em lavouras do município de Cacimbinhas, e em feiras-livres do município de Maceió, ambos em Alagoas.

Porções da zona de transição entre tecido sadio e doente foram desinfetadas superficialmente em hipoclorito de sódio (NaOCl) [10 000$\mu g_{*}mL^{-1}$] durante 3 min, seguida por duas lavagens sucessivas com água destilada estéril (ADE), e depositadas em placas de Petri contendo meio BDA (batata 20%, dextrose 2%, aguar 1,5%) acrescido de 0,1% de Tetraciclina.

As colônias resultantes, após incubação de cinco dias a 25ºC ± 2 e 12h de luminosidade, foram individualizadas em outras placas de Petri contendo BDA. Dessa vez foram incubadas durante 10 dias a 27ºC. Dessas placas foram preparadas suspensões conidiais mediante a adição de 20mL de ADE seguida de leve esfregaço sobre o meio de cultivo. A suspensão de conídios resultante foi filtrada em quatro dobras de compressa cirúrgica estéril e então foi ajustada para a concentração de 10^3 conídios.mL^{-1}.

Cem µL dessa suspensão ajustada foram espalhados sobre meio AA (aguar 1,5%, água) em placas de Petri, as quais foram então incubadas no escuro a 25ºC. Em intervalos regulares de uma hora as placas foram examinadas ao microscópio, e os conídios germinados foram individualmente transferidos para placas de Petri contendo meio BDA. Foram considerados geminados os conídios que emitiram tubo germinativo de tamanho igual ou superior ao seu comprimento.

Assim, após incubação a 27ºC e 12h de luminosidade, obteve-se colônias monospóricas de cada isolado. Estas foram então repicadas para tubos inclinados contendo BDA os quais foram armazenados a 4ºC ao abrigo da luz. Os cultivos monospóricos também foram preservados imersos em ADE, e mantidos ao abrigo da luz à temperatura ambiente.

Candidatos a isolados não patogênicos foram obtidos da coleção de fungos da Clínica Fitossanitária do Centro de Ciências Agrárias (CECA) vinculada à Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

3.2 Produção de plantas Micro-Tom

Para produzir plântulas a serem usadas em experimentos que requeriam a inoculação de *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom, após semeadura sobre substrato Plantmax® e vermiculita (1:1), as plântulas geradas foram transferidas para vasos com capacidade para 300 mL contendo a mesma formulação de substrato acrescida de1g de NPK (10:10:10)/L e 4g de calcário dolomítico (Ca e Mg)/L. As plantas foram então mantidas em casa de vegetação sob temperatura de 20ºC ± 8 recebendo 1g de NPK (10:10:10)/L de substrato em intervalos de 15 dias. A irrigação foi realizada em intervalos de 48h ± 24 mantendo a umidade do substrato próximo à capacidade de campo.

Todas as sementes foram gentilmente doadas pelo Dr. Lázaro Eustáquio Pereira Peres (Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba - SP).

3.3 Produção otimizada de conídios

A fim de obter um protocolo para produção de inóculo foram testados os meios de cultivo sólidos: Batata-Dextrose-Agar (BDA; 20% batata, 2% dextrose), Aveia-Agar (AvA; 7,5% Aveia em flocos), Yeast Carbon Base–Agar (YCB; 1,17% y*east carbon base*), Mathur's modificado (MS; 0,1% extrato de levedura, 0,1% bactopeptona, 1% sacarose, 0,25% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,27% KH_2PO_4), Agar-V8 (AV8; 10% suco V8, 0,2% $CaCO_3$), Agar-Malte (AM; 2% extrato de malte, 2% dextrose, 0,1% peptona). Todos os meios de cultivo continham 1,5% de agar.

O isolado CF15 de *Colletotrichum* foi repicado para os cinco diferentes meios de cultivo em três repetições biológicas. As quais foram incubadas escuro à temperatura de 25ºC ± 2 durante dez dias. O diâmetro do micélio crescido, de cada repetição biológica, foi então aferido ao sétimo dia de crescimento. Desse modo então a taxa de crescimento micelial foi calculada através da equação: $TC(mm*dia^{-1}) = D*N^{-1}$, onde, D = Diâmetro médio atual e N = Número de dias após a inoculação.

Decorridos 10 dias de crescimento micelial foi avaliada a produção de conídios. Para tanto uma suspensão conidial foi preparada com 10mL de água destilada estéril, seguida de contagem ao hemacitômetro. As médias aritméticas entre as repetições foram calculadas, para cada tratamento de ambos os experimentos, e estas foram submetidas a uma análise de variância pelo teste de *Tukey* no nível de 5% de probabilidade. Tal teste foi aplicado usando a sequencia lógica do programa de computador *Assistat 7.6 Beta*.

3.4 Identificação dos isolados de *Colletotrichum*

3.4.1 Morfocultural

Para poder observar as características da colônia bem como obter esporos para morfometria, cada isolado monospórico foi repicado para placas de Petri contendo meio BDA e incubados durante 10 dias no escuro a temperatura de 27ºC. Decorrido esse tempo, as colônias formadas foram fotografadas e informações quanto à forma, textura e coloração foram coletadas. Dessas colônias foram preparadas suspensões de conídios as quais foram ajustadas para a concentração de 10^3 conídios.mL^{-1}.

Uma gota de 50µL de cada suspensão foi depositada sobre lâmina de vidro para microscopia em cinco repetições. As lâminas contendo as gotas foram então submetidas à condição de câmara úmida até a germinação dos conídios e formação de apressórios. Os conídios germinados foram então fixados mediante a adição de uma gota de lactofenol (ácido lático, H_2O, fenol, glicerina 1:1:1:2; 0,5% de azul de algodão) mais solução de Shear (H_2O, glicerina, etanol 95% 5:2:3; acetato de potássio 3%) e montados entre lâmina e lamínula.

Cinquenta conídios e apressórios foram medidos bidimensionalmente (comprimento, largura e relação entre ambas) ao microscópio de luz acoplado ao sistema de captura de imagem. As medições sobre as imagens capturadas foram feitas com o programa de computador *Bel MicroImage Analizer 2.3*. De posse desses dados foram calculados a média e o desvio padrão.

3.4.2 Molecular rDNA (ITS)

Visando ratificar a identificação morfológica e bioquímica por padrões eletroforéticos de proteínas, procedeu-se para viabilizar o sequenciamento e comparação entre as sequencias ITS dos isolados de *Colletotrichum* com as já depositadas em bancos de dados dessa natureza. Para tanto cinco discos de BDA (batata 20%, dextrose 2% e agar 1,5%) contendo micélio de cada isolado foram inoculados em 100mL do meio BD (20% batata, 2% dextrose) durante sete dias, a temperatura de 25 ±2ºC, e 12 horas de luz, com agitação contínua de 30rpm.

A coleta micelial de cada isolado foi feita por filtração seguida por duas lavagens sucessivas com ADE (água destilada esterilizada) gelada. Todo micélio foi então pulverizado na presença de nitrogênio líquido e armazenado à temperatura de -80ºC para uso futuro.

Aproximadamente 1g da massa micelial congelada foi pulverizada na presença de nitrogênio líquido. Na sequência foi adicionado 650µL de tampão de extração (3%CTAB, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris/HCl pH 8, 1% PVP) a cerca de 0,1g de tecido

micelial macerado. A mistura foi homogeneizada e incubada a 65ºC durante uma hora com vigorosas agitações a cada dez minutos.

A desproteinização foi feita mediante três lavagens com uma mistura de clorofórmio e álcool isoamílico (CIA) 24:1. Os ácidos nucleicos foram precipitados pela adição de 650µL de isopropanol gelado. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco à 37ºC e ressuspendido em 30µL de tampão de eluição (TE - 10 mM Tris, 1 mM EDTA acrescido de RNAse) pH 8.0. A concentração de DNA em cada amostra foi aferida em fluorômetro e uma alíquota foi ajustadas para $10ng*\mu L^{-1}$.

Aproximadamente 25ng de DNA foram usados em cada reação de PCR (*polimerase chain reaction*), além dos pares de iniciadores: ITS 1 e 4 e ITS 3 e 4. A reação de PCR foi realizada com o seguinte ciclo termal: 94ºC por 3min., seguido por 35 ciclos de denaturação a 94ºC por 1min., anelamento a 58ºC por 30s e alongamento a 72ºC por 1min, com uma etapa final de extensão a 72ºC por 7min. Parte dos produtos da PCR foram corados com *Sybr green* e após eletroforese de $3V*cm^{-1}$ durante pelo menos duas horas em gel de agarose 1,5%, foram visualizados por transluminação em luz ultravioleta.

A parte restante dos amplificados foram então precipitados pela adição de igual volume de isopropanol gelado e centrifugação a 13 000 rpm à 4ºC. O precipitado foi lavado com etanol 70% e seco por não mais que 10 min a 37ºC. Só então foi ressuspendido em água MilliQ. Após tal procedimento a concentração do precipitado foi aferida via florômetro e eletroforese em gel de agarose 2%. O DNA amplificado foi então diluído à concentração de $8ng*\mu L^{-1}$ e estocado a -80ºC para sequenciamento futuro.

3.5 Caracterização dos isolados de *Colletotrichum*

3.5.1 Teste de infiltração

Para investigar a produção de enzimas ou toxinas extracelulares produzidas pelos diferentes isolados, estes foram crescidos em meio de cultivo líquido rico em carboidratos e em outros meios de cultivo pobres suplementados com diferentes fontes de nitrogênio.

De cada isolado fúngico, cinco discos de BDA contendo micélio aos cinco dias de crescimento foram inoculados em 100 mL do meio BD (20% batata, 2% dextrose), YCB_{ta10}, YCB_{ta2} (1,17% *Yeast carbon base*, 10 e 2µM tartarato de amônio ($C_4 H_{12} N_2 O_6$)), YCB_{np10}, YCB_{np2} (1,17% *Yeast carbon base*, 10 e 2µM nitrato de potássio (KNO_3)) durante sete dias, a temperatura de 25 ±2ºC, sob fotoperíodo de 12 horas, com suave agitação contínua de 30rpm.

A massa micelial foi filtrada e o meio líquido (40mL) contendo as proteínas secretadas foi coletado. Após centrifugação a 10 000 rpm, 4ºC durante 30 minutos o

precipitado foi descartado e o sobrenadante foi armazenado a -20ºC. Dos meios líquidos de cultivo foram retiradas alíquotas de 1mL os quais foram contidos, individualmente, em seringas descartáveis de 3mL utilizadas para infiltrar três folíolos por planta de Micro-Tom aos 55 dias pós semeadura. Cada folíolo conteve três pontos de infiltração. As plantas foram inspecionadas diariamente, durante sete dias, em busca de alterações físicas nas adjacências dos pontos de infiltração.

3.5.2 Teste de patogenicidade

Para confirmar e/ou conhecer o comportamento patogênico ou não de cada isolado sobre *S. lycopersicum*, os isolados monospóricos foram cultivados em meio BDA durante sete dias. Depois foram sacados discos do meio contendo micélio da zona de crescimento ativo dos isolados. Tais discos foram inoculados sobre penta perfuração em folhas e frutos destacados de tomateiro. Todos foram previamente desinfetados superficialmente mediante lavagem com água e sabão seguida de imersão durante 20 minutos em solução NaOCl [300µg$*$mL^{-1}] e duplo enxague em ADE.

Um chumaço de algodão embebido em ADE foi envolto na extremidade proximal do pecíolo foliar, a qual foi depositada sobre placa de Petri assim como os frutos. Os órgãos inoculados foram mantidos em câmara úmida durante sete dias, período no qual foram examinados diariamente quanto à presença de cloroses, escurecimentos, necroses e lesões deprimidas.

Foram inoculadas três órgãos (repetição biológica) por isolado fúngico (tratamento) além de um controle negativo inoculado com discos de BDA asséptico. As parcelas que exibiam um ou mais desses sinais foram monitoradas e o diâmetro da lesão foi medido às 72hai (horas após inoculação).

Às 168hai foram fotografados pontos de inoculação foliolar de cada tratamento. Para tal empregou-se o microscópio estereoscópico conjugado ao sistema de captura de imagem. O aumento empregado foi de aproximadamente 40 vezes. As imagens foram tratadas quanto a brilho e contraste com o programa de computador *Microsoft® Picture Manager 2010 14.0* e o tamanho reconfigurado guardando as proporções da imagem original capturada. A média aritmética entre as repetições foi calculada para cada tratamento e estas submetidas a uma análise de variância pelo teste de *Tukey* no nível de 5% de probabilidade. Tal teste foi aplicado usando a sequencia lógica do programa de computador *Assistat 7.6 Beta*.

3.5.3 Avaliação da resistência

Objetivando identificar indícios de que tipo de resistência acontece na interação entre os isolados com monocotiledoneas (Musaceae) e rosides (Fabaceae) estes foram cultivados em meio BDA durante sete dias. Depois foram sacados discos do meio contendo micélio da zona de crescimento ativo de todos os isolados fúngicos. Tais discos foram inoculados sobre penta perfuração de agulha em folhas destacadas de *Phaseolus lunatus* e em frutos destacados de *Musa* sp.. Todos previamente desinfetados superficialmente mediante lavagem com água e sabão seguida de imersão durante 20 minutos em solução NaOCl [$300\mu g_{*}mL^{-1}$] e duplo enxague em ADE.

Os órgãos inoculados foram mantidos em câmara úmida durante dez dias, período no qual foram examinados diariamente quanto à presença de cloroses, escurecimentos, lesões deprimidas e necroses. As parcelas que exibiram um ou mais desses sintomas foram monitoradas e medidas no progresso daqueles sintomas (diâmetro da lesão). A média aritmética entre as repetições foi calculada para cada tratamento e estas submetidas a uma análise de variância pelo teste de *Tukey* no nível de 5% de probabilidade. Tal teste foi aplicado usando a sequencia lógica do programa de computador *Assistat 7.6 Beta*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção de isolados adaptados e não-adaptados a MicroTom

A prospecção de espécies de *Colletotrichum* adaptados a Solanaceae resultou na obtenção de cinco isolados monospóricos. Desses, quatro (CF13, CF 15, CF16 e CF17) foram isolados de uma única planta sintomática de tomateiro e o último deles (JL) isolado do fruto sintomático de *Solanum gilo*.

A ocorrência, em um mesmo indivíduo hospedeiro, de mais de um isolado de *Colletotrichum* com características morfofisiológicas distintas é amplamente relatada (MENEZES, 2006; HYDE et al., 2009; SERRA et al., 2011). Dessa observação depreende-se a plasticidade no estilo de vida do fungo quando em interação com aquele hospedeiro, podem atuar sobre o vegetal como patógeno, endofítico, ou ainda sofrer as limitações relativas a patógenos não adaptados (MENEZES, 2006; RANATHUNGE et al., 2012).

Respostas quanto ao estilo de vida e estratégia de infecção devem ser alcançadas através de testes de patogenicidade a Solanaceae e a outras famílias botânicas distantes filogeneticamente para entender mais sobre a complexa relação patógeno-hospedeiro moldada durante coevolução. (EL OIRDI, 2011; PIETERSE; DICKE, 2007). Baseado na distância filogenética com Solanaceae foram selecionados da coleção de fungos da Clínica Fitossanitária do CECA, os isolados WT13 oriundo de folhas de *Phaseolus lunatus* (fava) identificado como *C. truncatum* e CM obtido de frutos sintomáticos de *Musa* sp. (bananeira) identificado como *C. musae*. Ambos foram submetidos a novo processo de identificação morfológica e teste de patogenicidade a *Solanum lycopersicum*.

4.2 Produção otimizada de conídios

Os estudos de interação entre patógeno e hospedeiro requerem muitas vezes a inoculação dos tecidos vegetais com estruturas infectantes do microrganismo. Quando se investiga resistência do não-hospedeiro, a estrutura de dispersão do microrganismo é o principal produto para a inoculação, uma vez que observando a interação e desenvolvimento destas estruturas sobre o tecido vegetal é possível indicar onde a mesma não se adapta ao hospedeiro. Para *Colletotrichum* a estrutura dispersiva é o conídio, na natureza estes são produzidos preferencialmente em acérvulos, em condições artificiais são produzidos em pseudoacérvulos ou nas pontas das hifas, depois do necessário crescimento micelial e expólio de nutrientes.

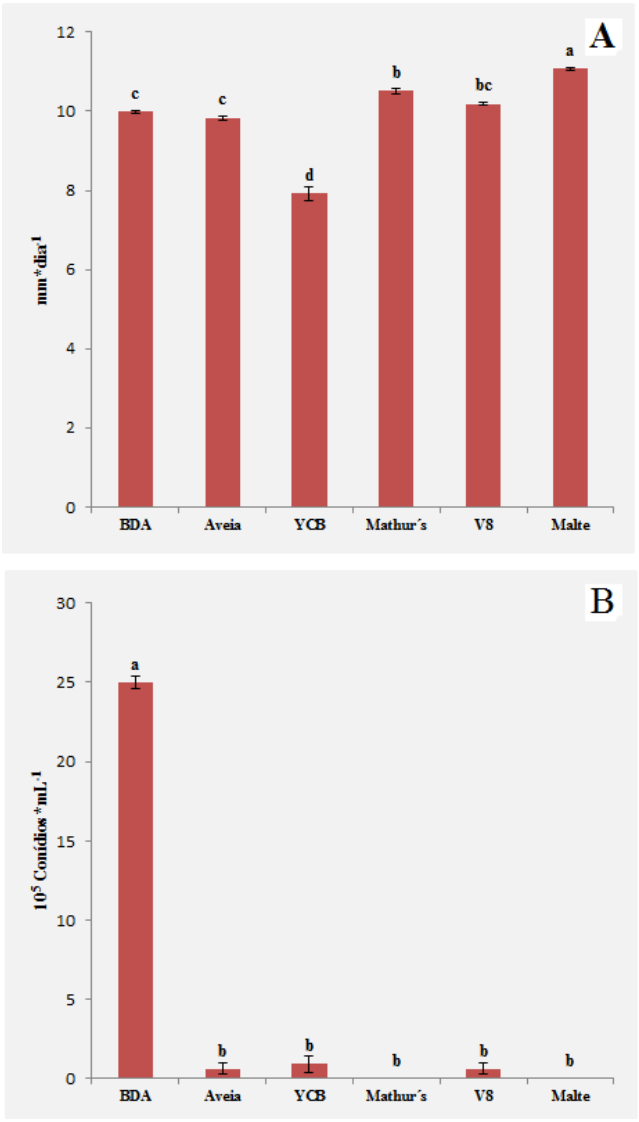
O teste de taxa de crescimento micelial frente a diferentes meios de cultivo sólido revelou que o meio de cultivo a base de Extrato de Malte (AM) proporcionou a maior taxa de

crescimento micelial para o isolado CF15, diferindo estatisticamente dos demais meios de cultivo testados. O meio de cultivo Mathur's (MS) não diferiu do AV8 enquanto este não diferiu do BDA nem do Aveia (AvA). Contudo todos diferem de YCB o qual proporcionou a menor taxa de crescimento micelial do isolado CF15 entre os meios de cultivo testados (Figura 2).

A presença de uma fonte proteica na formulação dos meios de cultivo que obtiveram os melhores resultados, AM – peptona e MS – bactopeptona, como também observado por Couto e Menezes (2004) estudando o efeito da nutrição sobre crescimento micelial e esporulação de *C musae*, essas observações apontam para a importância desse ingrediente em experimentos onde é requerido um crescimento micelial rápido com esperada consequência do incremento na massa seca. Muito embora, os protocolos habituais de produção micelial para extração de biomoléculas sugiram o meio de cultivo Emerson (0,4% extrato delevedura, 1,5% amido, 0,1% K2HPO4, 0,05% MgSO4) (XIAO et al., 2004).

Couto e Menezes (2004) observaram a mesmo efeito sobre a produção de conídios da maioria dos isolados utilizados naquele estudo. No entanto a quantificação da produção de conídios no presente estudo mostrou que a maioria dos meios de cultivo não diferem estatisticamente, exceto o meio de cultivo BDA o qual proporcionou uma produção de conídios 26,8 vezes superior ao meio YCB (Figura 2B), o segundo melhor. Embora o coeficiente de variação deste ensaio tenha ficado dentro de limites aceitáveis em experimentos biológicos (12,89%).

Figura 2 – Comportamento do isolado CF15 frente a diferentes meios de cultivo. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente no teste de *Tukey* (p < 0.05). A - Taxa de crescimento micelial em sete dias (dms = 0,39 CV% = 1,45). B - Produção média de conídios no décimo dia (dms = 1,6 CV% = 12,89).



Fonte: AUTOR

4.3 Identificação dos isolados de *Colletotrichum*

4.3.1 Morfocultural

Para identificar inicialmente os isolados de *Colletotrichum* desse estudo foi utilizada a caracterização morfocultural baseada em aspectos como cor e textura da colônia, além da morfometria de conídios e apressórios, tais observações revelaram para o isolado CF13 uma coloração salmão escurecida com micélio aéreo esbranquiçado, textura cotonosa pouco densa e presença de corpos de frutificação associados a gotículas translúcidas, aparentemente composta por água (Figura 3A). As dimensões médias dos conídios foram de 22,96µm ± 1

por 3,19µm ± 0,3 e dos apressórios de 16,26µm ± 2,5 por 7,07µm ± 0,6 (Figura 5). Essas características identificaram o isolado como *Colletotrichum gloeosporioides* (*C.g.1*) segundo Sutton (1980).

Ainda baseado no mesmo autor o isolado CF15 por exibir coloração branca amarelada, acinzentado no centro da colônia, textura compacta aveludada (Figura 3B) e o verso uniformemente branco amarelado, conídios retos e fusiformes constritos medianamente com dimensões médias de 19,11µm ± 1,2 por 3,63µm ± 0,4 e apressórios medindo 14,71µm ± 1,3 por 7,7µm ± 1 (Figura 4A e B), e por ter sido isolado de uma Solanaceas, trata-se de *Colletotrichum coccodes.*

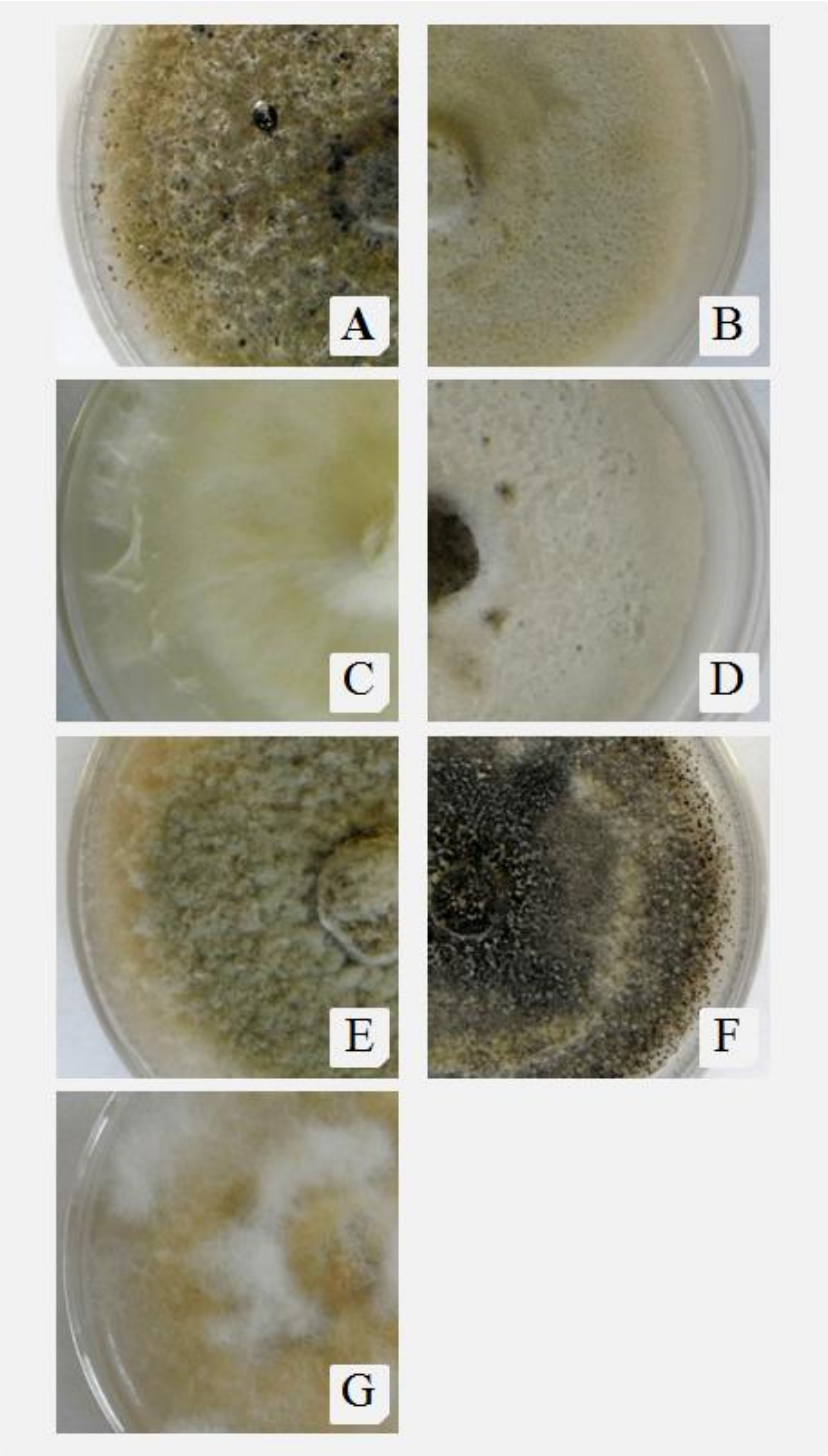
As colônias do isolado CF16 apresentaram massa micelial branca e pouco densa (Figura 3C), no entanto não foram produzidos conídios até o momento da avaliação. Por isso não foi possível identificar tal isolado. Já o isolado CF17 apresentou micélio salmão esbranquiçado (Figura 3D) de verso negro e textura compacta aveludada, os conídios exibiram dimensões médias de 22,95µm ± 0,8 por 3,15µm ± 0,2, já nos apressórios foram de 16,83µm ± 2,4 por 6,99µm ± 0,5 (Figura 5). Assim, de acordo com Sutton (1980), trata-se de *C. gloeosporioides* (*C.g.2*) assim como o isolado CF13, inicialmente ambos os isolados foram separados devido a características culturais distintas após o isolamento enquanto ainda em colônia multispórica. Uma vez que, segundo Photita et al. (2005) a caracterização baseada somente em caracteres morfológicos muitas vezes não é descritiva para separar espécies de *Colletotrichum*, outras abordagens e técnica devem ser empregadas com essa finalidade.

O isolado JL mostrou massa micelial cinza esbranquiçada de bordas salmão, textura aveludada densa (Figura 3E) e o verso branco amarronzado mais escuro ao centro da colônia. Somada a morfometria dos conídios 15,18µm ± 1,5 por 3,54µm ± 0,4 e apressórios 8,59 µm ± 0,5 por 5,96µm ± 0,4 (Figura 4C e D), logo o isolado Jiló foi compatíveis com *Colletotrichum acutatum* (*C.a.*) (SUTTON, 1980).

Os isolados obtidos da Clínica Fitossanitária tiveram a identificação confirmada. O *Colletotrichum truncatum* (*C.t.*) possui colônia negra acinzentada de bordas esbranquiçadas, micélio aveludado e pouco denso (Figura 3F). Pseudoacérvulos puderam ser observados sob a forma de granulações por toda superfície do meio de cultivo. Os conídios fortemente falcados medindo 24,57µm ± 0,6 por 3,34µm ± 0,6, apressórios com dimensões de 16,33µm ± 0,8 por 8,23µm ± 0,4 (Figura 5) e a relação com Fabaceae confirmaram o isolado WT13 como *C. truncatum.* O *Colletotrichum musae* (*C.m.*) mostrou micélio flocoso e porções salmão com micélio submerso e outras brancas aveludadas (Figura 3G). Corpos de frutificação negros foram observados no verso e reverso neste último também foi possível observar uma

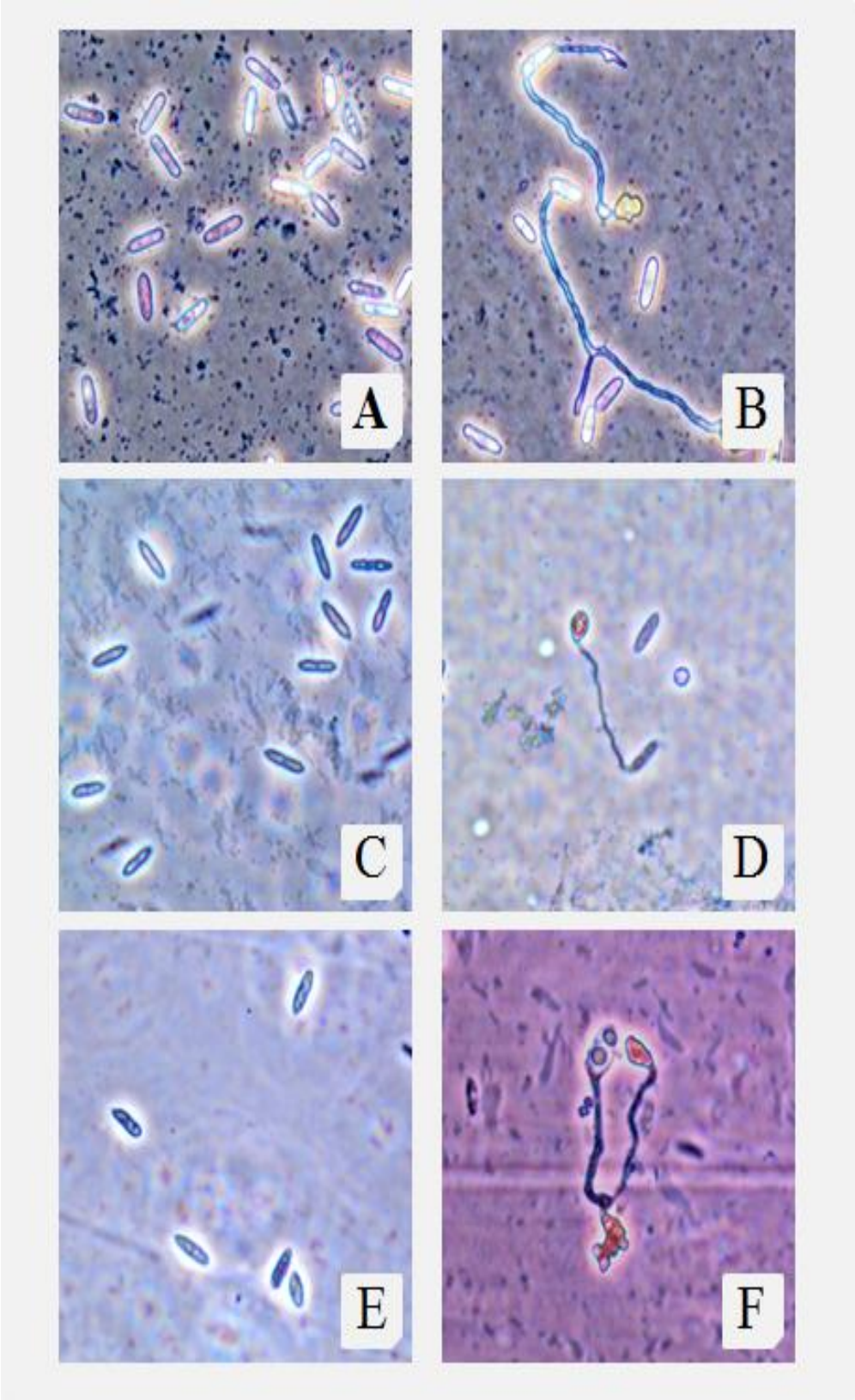
mucilagem alaranjada sobre os corpos de frutificação. Tal mucilagem também foi observada por Couto e Menezes (2004). Os conídios medindo 10,86µm ± 1,2 por 4,73µm ± 0,7 e os apressórios com 9,14µm ± 1,4 por 7,19µm ± 1,2 (Figura 4E e F) confirmam a identificação.

Figura 3 - Colônias de *Colletotrichum* spp. aos 10 dias de crescimento sobre BDA a 25ºC e 12h de luz. A – CF13 - *C. gloeosporioides* (*C.g.1*), B – CF15- *C. coccodes* (*C.c.*), C – CF16, D – CF17- *C. gloeosporioides* (*C.g.2*), E – JL- *C. acutatum* (*C.a.*), F – *C. truncatum* (*C.t.*), G – *C. musae* (*C.m.*).



Fonte: AUTOR

Figura 4 - Conídios e apressórios de *Colletotrichum* x400. A e B – *C.c*, C e D – *C.a.*, E e F – *C.m.*



Fonte: AUTOR

Figura 5 – Quadro-resumo das características analisadas para identificar morfometricamente os isolados de *Colletotrichum*..

Isolado	Espécie	Abreviatura	Hospedeiro	Colônia	Conídio (µm)	Apressório (µm)
CF13	*Colletotrichum gloeosporioides*	*C.g.1*	*Solanum lycopersicum*	Salmão e branca	22,96 ± 1 x 3,19 ± 0,3 C/L 7,28 ± 0,8	16,26 ± 2,5 x 7,07 ± 0,6 C/L 2,31 ± 0,4
CF15	*C. coccodes*	*C.c.*	*S. lycopersicum*	Branca amarelada e cinza	19,11 ± 1,2 x 3,63 ± 0,4 C/L 5,32 ± 0,6	14,01 ± 1,3 x 7,72 ± 1 C/L 1,94 ± 0,3
CF16	-		*S. lycopersicum*	Branca	-	-
CF17	*C. gloeosporioides*	*C.g.2*	*S. lycopersicum*	Salmão e branca	22,95 ± 0,8 x 3,15 ± 0,2 C/L 7,33 ± 0,7	16,83 ± 2,4 x 6,99 ± 0,5 C/L 2,41 ± 0,3
JL	*C. acutatum*	*C.a.*	*S. gilo*	Cinza e salmão	15,18 ± 1,5 x 3,54 ± 0,4 C/L 4,36 ± 0,7	8,59 ± 0,5 x 5,96 ± 0,4 C/L 1,44 ± 0,1
WT13	*C. truncatum*	*C.t.*	*Phaseolus lunatus*	Cinza e banca	24,57 ± 0,6 x 3,34 ± 0,6 C/L 7,67 ± 1,6	16,33 ± 0,8 x 8,23 ± 0,4 C/L 1,99 ± 0,1
CM	*C musae*	*C.m.*	*Musa* sp.	Salmão e branca	10,87 ± 1,2 x 4,7 ± 0,7 C/L 2,3 ± 0,5	9,14 ± 1,4 x 7,19 ± 1,2 C/L 1,29 ± 0,2

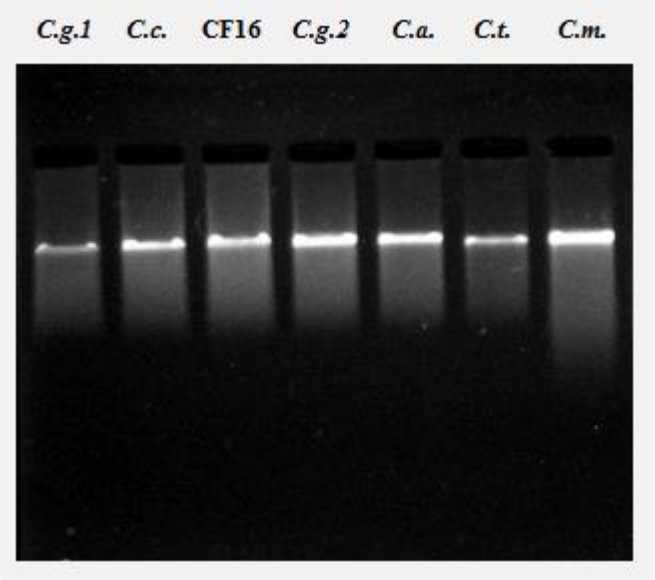
Fonte: AUTOR

4.3.2 Molecular rDNA (ITS)

A identificação de *Colletotrichum* baseada apenas na morfologia, tamanho e forma de conídios, aspecto e coloração da colônia, é problemática devido aos poucos caracteres analisados para separar espécies e subespécies, os quais podem também ser imprecisos para tal (CAI et al., 2011, KO KO et al., 2011). Aliada a isso a plasticidade de características morfológicas influenciadas pelas variações ambientais e a existência de formas intermediárias tornam os caracteres morfológicos inapropriados para sozinhos discernir entre espécies de *Colletotrichum* (PHOTITA et al., 2005). Assim, técnicas moleculares oferecem métodos alternativos à caracterização morfológica e fisiológica para estudos de taxonomia em fitopatologia (BORMAN et al., 2008). Além de serem usadas em estudos ecológicos que buscam identificar indivíduos ou clones dentro de populações (GLASS; DONALDSON, 1995). Esses estudos baseiam-se principalmente na análise das sequencias de nucleotídeos de regiões conservadas do genoma fúngico.

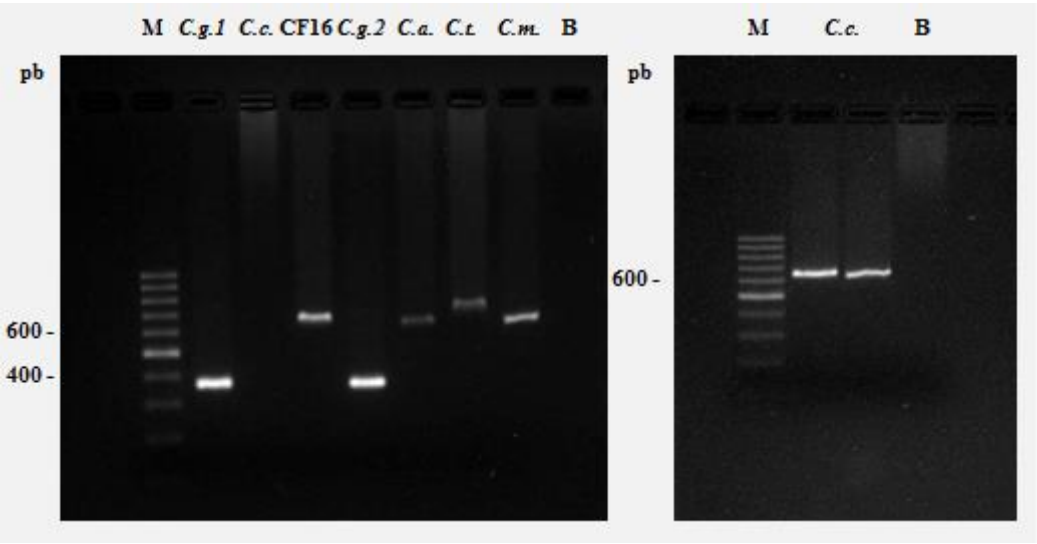
A maioria das análises filogenéticas focam no DNA ribosomal (rDNA), que contem repetições conjugadas de três genes (28S, 18S, e 5.8S) (GLASS; DONALDSON, 1995; GIARETTA et al., 2010). Utilizando iniciadores ITS (*internal transcribed spacer*), comparações entre as sequencias de DNA são usadas para inferir sobre relações evolucionárias entre diferentes grupos fúngicos (BRUNS et al., 1992). Previamente à análise de sequencias é necessária a extração e amplificação da região conservada alvo. O método de extração empregado nesse estudo mostrou-se eficaz para todos os isolados (Figura 6). No entanto a instabilidade do ácido nucleico pós-extração dificultou a reação de PCR para o isolado CF15. Todos os isolados amplificaram com a combinação de iniciadores ITS 3 e 4, de outro modo foi a combinação ITS 1 e 4 a qual não foi efetiva em amplificar a região alvo dos isolados CF13 e CF17, ambos identificados morfologicamente como *C. gloeosporioides* (Figura 7).

Figura 6 – DNA genômico submetido a duas horas de eletroforese 3V*cm^{-1} em gel de agarose 0,8%.



Fonte: AUTOR

Figura 7 – Produto de PCR visualizado após duas horas de eletroforese 3V*cm^{-1} em gel de agrose 1,5%. Utilizou-se a combinação de iniciadores ITS 3 e 4 para *C.g.1* e *C.g.2* e ITS 1 e 4 para os demais. A direita amplificação realizada somente *C.c.*, visto a ausência de amplificação na primeira PCR.



Fonte: AUTOR

O fato de que os isolados *C.g.1* e *C.g.2* amplificaram com a combinação ITS 3 e 4 porém não com ITS 1 e 4 sugere algum problema no anelamento do iniciador ITS1, se por não complementaridade reforça o observado por White et al. (1990) quando desenvolveram iniciadores espécie-específicos baseados na sequencia de ITS1 para *C. gloeosporioides*. De forma semelhante fez Sreenivasaprasad et al. (1996) para *C, acutatum*, no entanto a amplificação com os iniciadores ITS 1 e 4 no presente estudo não demonstrou qualquer problema para *C.a.*, requerendo confirmação da caracterização morfológica.

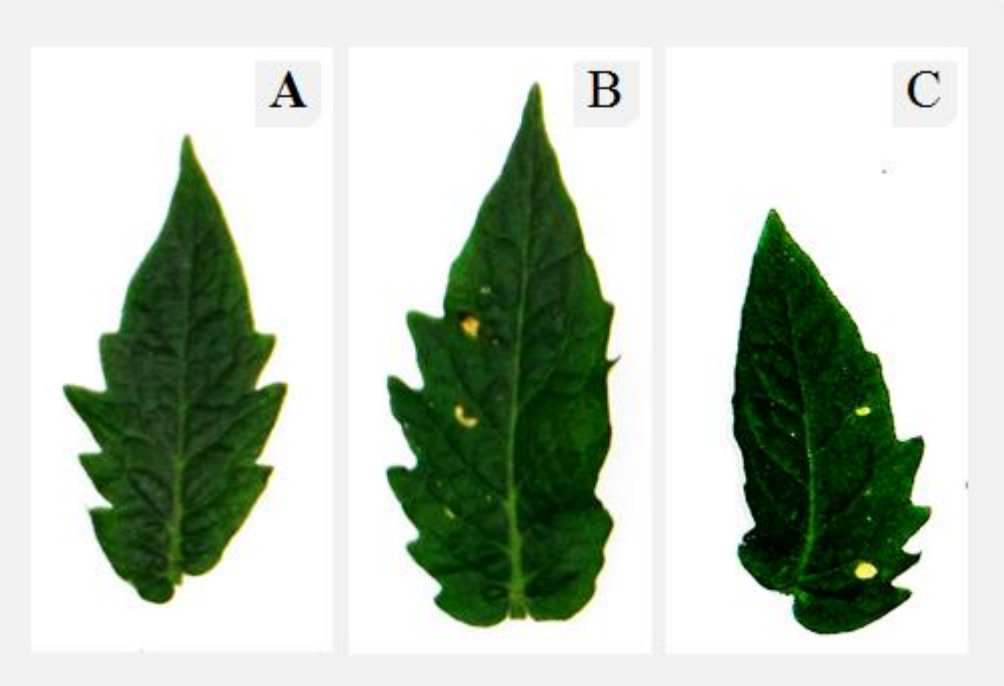
No *International Nucletoide Sequence Databases* já há depositadas sequências ITS de *Colletotrichum* e *Glomerella* e estes dados são frequentemente usados para o diagnóstico de espécies do gênero (LOBUGLIO; PFISTER, 2008, CROUCH et al., 2009). No entanto o ITS sozinho não pode ser usado para uma identificação confiável de espécie, principalmente para as espécies do complexo *C. gloeosporioides* (CAI et al., 2009), estima-se que mais de 86% dos chamados *C. gloeosporioides* no GenBank divergem filogeneticamente do espécime tipo (CANNON et al., 2008), provavelmente tratam-se de outras espécies de *Colletotrichum*. Possivelmente a identificação molecular baseada na sequencia ITS de *C.g.1* e *C.g.2* seja dificultada por esse fato.

4.4 Caracterização dos isolados de *Colletotrichum*

4.4.1 Teste de infiltração

Os fungos dispõem de um amplo arsenal enzimático extracelular que desempenha um papel importante na patogênese permitindo a penetração e colonização do tecido hospedeiro. (JARAMILLO, 2013; VALUEVA; MOSOLOV, 2004). O experimento objetivou caracterizar os isolados pela reação do tecido vegetal quando infiltrado com proteínas ou toxinas secretadas em meio de cultivo. Os resultados ajudam na caracterização da patogenicidade, agressividade e tipo de interação entre fungo e planta. Assim avaliando a atividade das proteínas fúngicas secretadas em meio de cultivo líquido contra o tecido foliar de Micro-Tom observou-se a promoção de lesões no extrato de *C.g.2* em meio rico em carboidrato (BD+*C.g.2*, Figura 8B), e no extrato de *C.c.* tendo como fonte de nitrogênio nitrato de potássio (YCB_{np10}+*C.c.*, Figura 8C).

Figura 8 - Folhas de Micro-Tom infiltradas com meio de cultivo líquido onde cresceram *Colletotrichum* spp.. A – ADE. B – BDA+*C.g.2*, C – YCB_{np10}+*C.c.*).



Fonte: AUTOR

A provável produção e excreção de toxinas ou de enzimas envolvidas na degradação celular foi observada para isolado *C.g.2* somente quando este cresceu em meio líquido BD rico em carboidratos, podendo esse fenômeno indicar a influência do estado nutricional fúngico sobre a patogenicidade do mesmo. O isolado *C.c*, produziu enzimas ou toxinas quando cresceu em meio líquido pobre de composição semelhante ao meio sólido (YCB) empregado no experimento de taxa de crescimento micelial onde apresentou o menor crescimento (Figura 2A), suplementado com 10µM de KNO_3. No mesmo meio com redução da fonte de nitrogênio (2µM de KNO_3) o isolado *C.c.* não exibiu o mesmo comportamento. O estresse nutricional adicional causado pela redução de nitrogênio anulou a produção do fator que causa morte do tecido. A redução de nitrogênio ou alteração da relação Carbono e Nitrogênio teve efeito na produção dos elementos que causaram a morte do tecido infiltrado, devendo esta relação nutricional ser explorada. Sugerindo o estresse causado pela falta de nitrogênio que além do estresse nutricional a concentração da fonte de nitrogênio também implica na produção das substâncias nocivas ao tecido vegetal.

De maneira geral a adaptação metabólica para aproveitar melhor uma ou outra fonte de carboidrato é bastante variável, incluso entre isolados da mesma espécie como observado por Barbosa et al (2002) estudando as melhores fontes de carboidrato e nitrogênio, além da relação C/N ideal para crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii*.

Mafacioli et al. (2008) estudando a variação na agressividade de *C.gloeosporioides*, isolado de folhas de pupunha *Bactris gasipaes* monocotiledonea (Arecaceae), crescidos em diferentes fontes de carboidrato verificaram que a agressividade foi maior quando o fungo foi nutrido com amido em vez de glicose ou maltose. Tal fenômeno pode estar relacionado à dificuldade de digestão e assimilação do amido, um polímero maior que à glicose e a maltose ou ainda o amido é uma fonte mais energética e portanto nutri melhor o fungo, o qual produz conídios de maior vigor e capacidade de suplantar as defesas basais do vegetal e causar doença.

No presente experimento relação semelhante não se aplica, pois a causa das lesões foi provavelmente uma enzima ou toxina secretada no meio de cultivo líquido durante o crescimento fúngico e não devido a conídios mais vigorosos. Isso aponta para uma possível estratégia necrotrófica empregada por *C.g.2* e *C.c*. quando, o primeiro, em condição abundante em nutriente e o segundo em condição deficiente de nutrientes. Essa suposição pode ser reforçada em um teste de patogenicidade sobre folhas e frutos de tomateiro, desse modo espera-se que sobre folhas de tomateiro onde a reserva de amido tende a ser menor *C.c.* seja mais agressivo ao passo que sobre frutos de tomateiro um órgão com reserva energética maior *C.g.2* seja mais agressivo.

4.4.2 Teste de patogenicidade

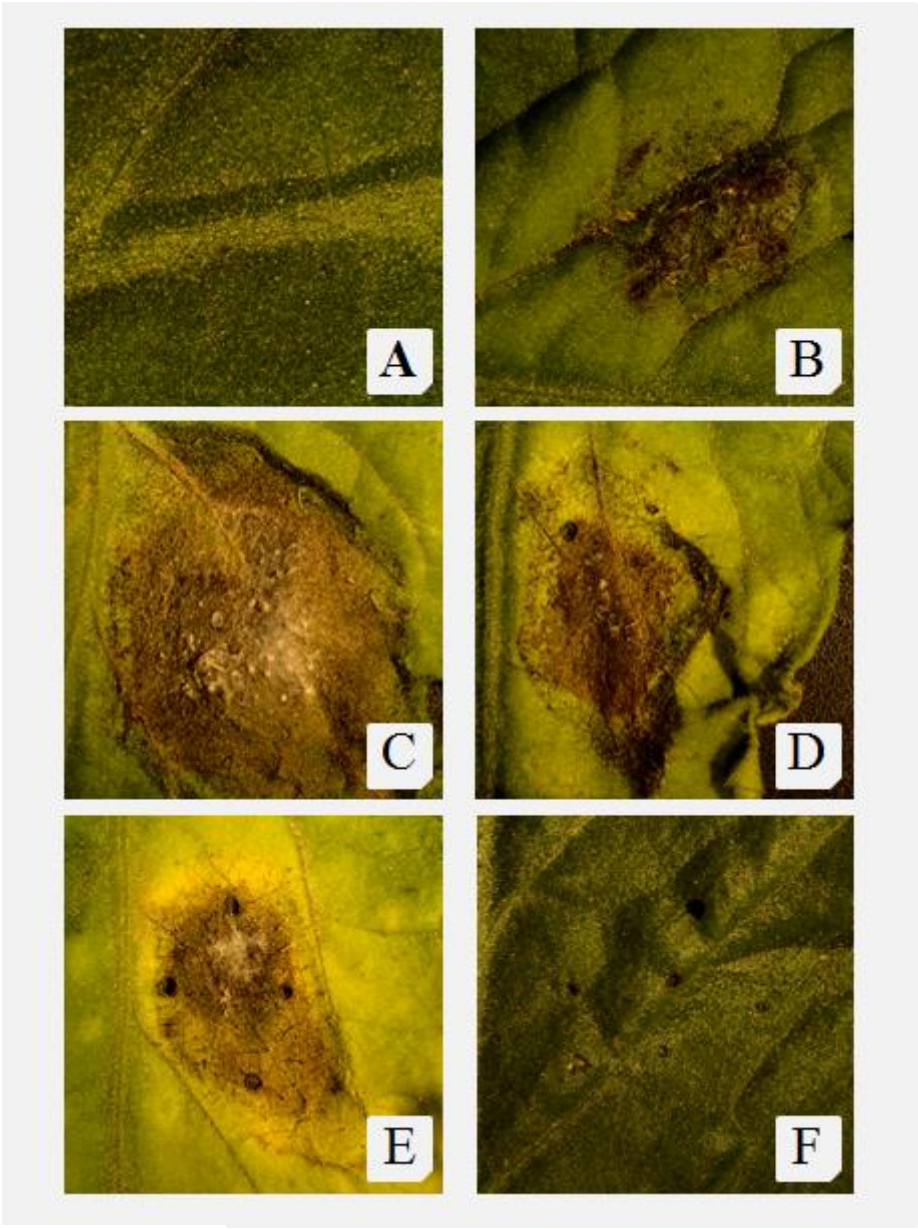
O teste foi realizado para confirmar o comportamento como patógeno adaptado e não adaptados das diferentes espécies de *Colletotrichum* avaliadas nesse estudo correlacionando com os resultados obtidos no teste de infiltração. Inicialmente procedeu-se ao teste de patogenicidade sobre folhas e frutos de *S. lycopersicum*. O teste revelou que todos os isolados (*C.g.1, C.c.*, CF16, *C.g.2* e *C.a*.) são patogênicos e portanto adaptados a colonizar folhas e frutos de *S. lycopersicum* (Figuras 9 e 10). Considerando que os quatro primeiros foram isolados da mesma planta a patogenicidade dos mesmos pode habilitá-los como modelo para estudos focados no sinergismo entre as espécies de patógeno durante interação com um hospedeiro. Tal abordagem de pesquisa tem sido requerida e ansiada, pois pode contribuir para o conhecimento ecológico e mais próximo do que ocorre na natureza quando o hospedeiro interage simultaneamente com vários patógenos e mutualistas (Morris *et al*., 2007).

Uma gradação da agressividade sobre folhas foi observada. O isolado CF16 foi o mais agressivo considerando o diâmetro absoluto da lesão, no entanto o mesmo não diferiu estatisticamente de *C.g.1* e *C.g.2*. Em um nível de agressividade menor estão *C.c.* e *C.a.* e no extreme inferior estão *C.t.* e *C.m.* os quais não causaram doença sobre folhas de *S.*

lycopersicum (Figuras 9F e 10G e H). Sobre frutos, embora observada uma variação nos valores absolutos do diâmetro médio de lesão entre *C.c.*, CF16 e *C.g.2* os quais produziram lesões maiores que *C.g.1* e *C.a.,* não houve diferença estatística entre os cinco. O ensaio confirma que *C. trucantum* (*C.t.)* e *C. musae* (*C.m)* são patógenos não-adaptados a *S. lycopersicum.* A resistência do não-hospedeiro (NHR) de *S. lycopersicum* foi confirmada para *C.t.* e *C.m.* os quais não causaram doença sobre folhas nem frutos, portanto mostraram-se não-adaptados a colonizar tecidos testados de *S. lycopersicum*.

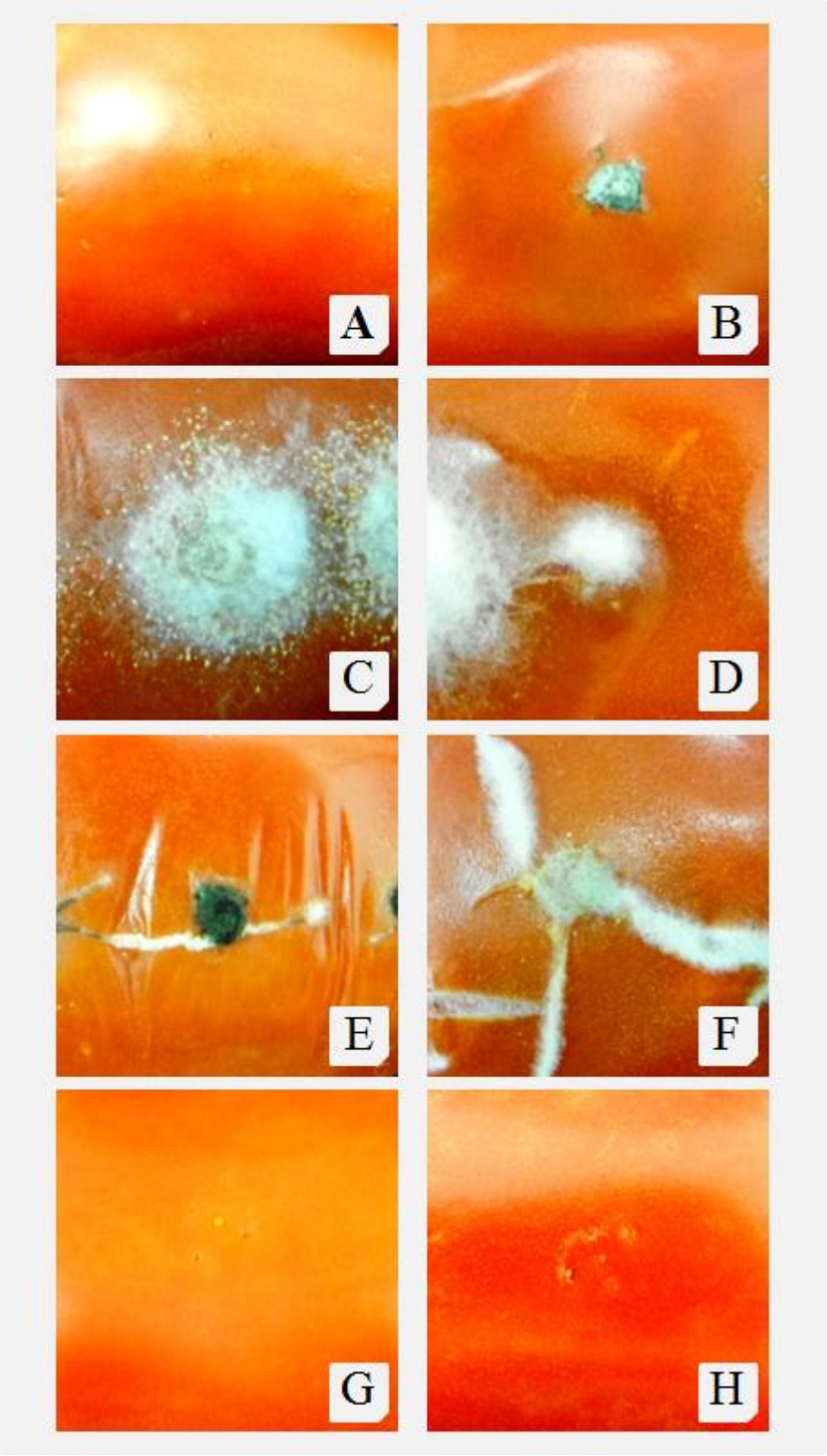
Os resultados do teste de patogenicidade quando confrontados com os do teste de infiltração sugerem que a produção de enzimas hidrolíticas e toxinas não é essencial para a patogenicidade das espécies *C.g.1*, CF16 e *C.a.*. As lesões ocasionadas por *C.g.2* e *C.c.* no teste de infiltração apontam para que ambos utilizem uma estratégia necrotrófica de nutrição e consequente infecção revelando haver diferença intraespecífica nessa característica (*C.g.1* e *C.g.2*). Suspeitou-se que *C.c* seria mais agressivo sobre folhas e *C.g.2* sobre frutos devido a disponibilidade energética nos diferentes órgãos vegetais. Os resultados demonstraram o contrário *C.c.* mostrou-se menos agressivo sofre folhas que *C.g.2* em valores absolutos, muito embora *C.c* e *C.g.2* não tenham diferido estatisticamente (Figura 11).

Figura 9 - Folhas Micro-Tom após 168 h da inoculação com discos de BDA contendo micélio. A- testemunha, B – *C.c.*, C – CF16, D – *C.g.2*, E – *C.a.*, F – C.t..



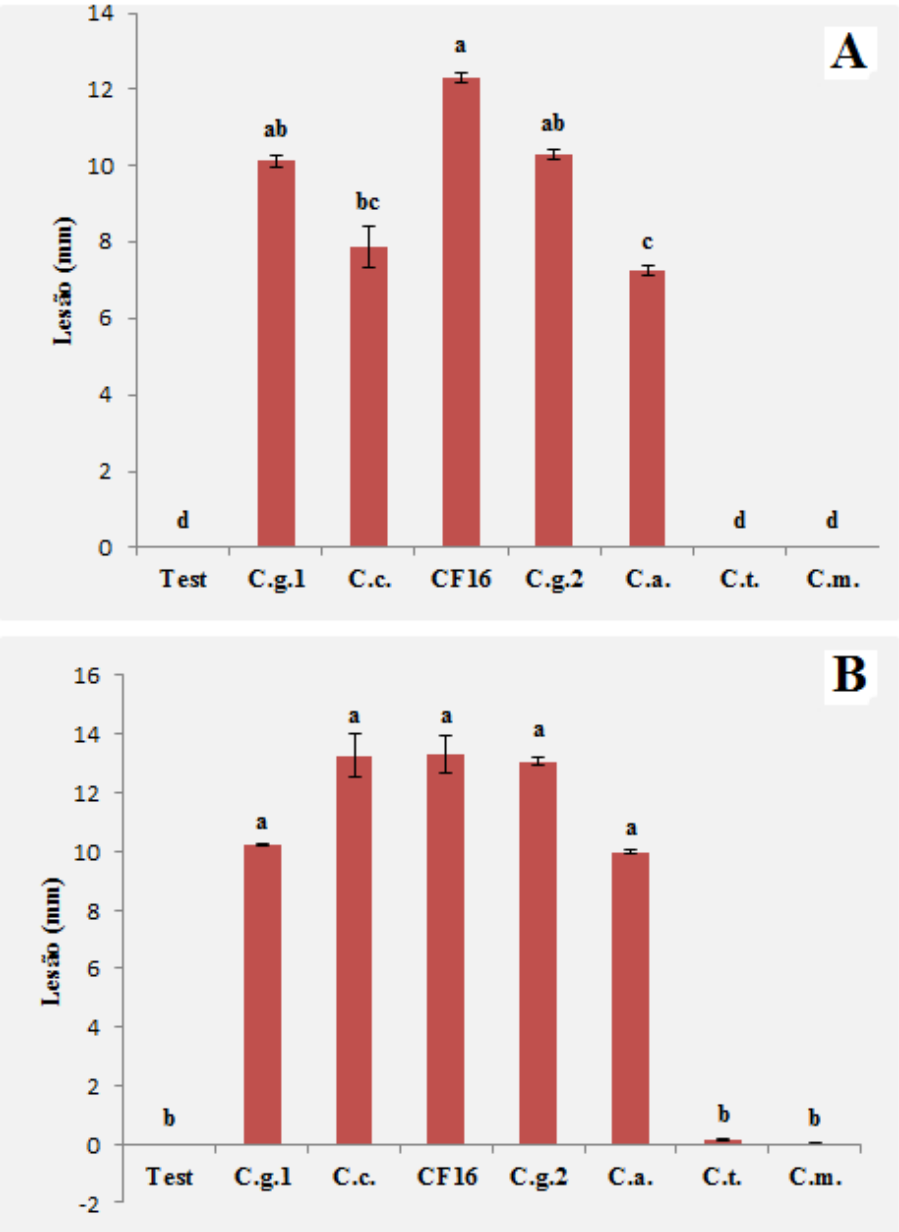
Fonte: AUTOR

Figura 10 - Frutos de tomateiro inoculados com discos de BDA contendo micélio. A – testemunha, B – *C.g.1*, C – *C.c*, D – CF16, E – *C.g.2*, F – *C.a.*, G – *C.t.*, H – *C.m.*.



Fonte: AUTOR

Figura 11 - Teste de patogenicidade sobre folhas (A) e frutos (B) destacados de tomateiro. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente no teste de *Tukey* (p < 0.05). A – dms = 2,53 CV% = 14,95. B – dms = 5,63 CV% = 26,58.



Fonte: AUTOR

4.4.3 Avaliação da resistência

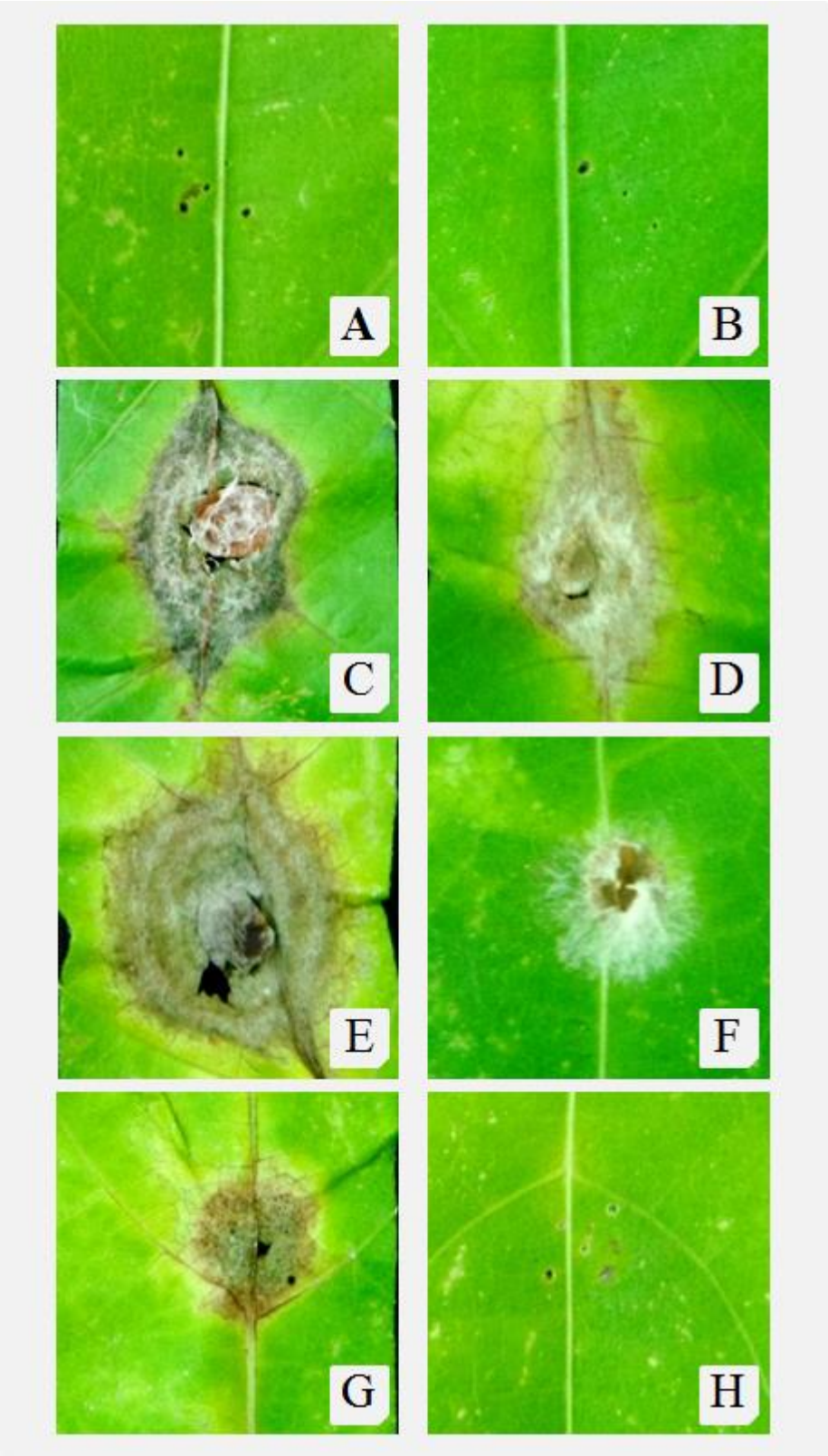
No teste de patogenicidade sobre folhas e frutos de *S. lycopersicum*, *C.t.* e *C.m.* comportaram-se como fungos não adaptados, isso os elege como espécies contrastantes a aquelas patogênicas a tomateiro em estudos de interação planta-patógeno. Logo a seleção de espécies adaptadas a Solanaceae e não adaptadas a Fabaceae e Musaceae, bem como a seleção de espécies adaptadas às três famílias botânicas é de especial interesse para estudos de NHR

com abordagem ecológica e evolutiva, visto que a complexa relação de ataque e defesa entre vegetais e microrganismos foi moldada mediante co-evolução (EL OIRDI, 2011).

A investigação de espécies adaptadas e não adaptadas a Fabaceae e Musaceae procedeu-se com o teste de severidade a folhas de *Phaseolus lunatus* e frutos *Musa* sp., o qual revelou que todas as espécies foram patogênicas a folhas de *P. lunatus* exceto *C.g.1* e *C.m.* Ambos não diferiram estatisticamente entre si e nem da testemunha não inoculada (Figuras 12 e 14A). Contra frutos destacados de *Musa* sp. fica clara a patogenicidade apenas de *C.m.* dentre as espécies testadas, apesar do alto coeficiente de variação 33,63% (Figuras 13 e 14B).

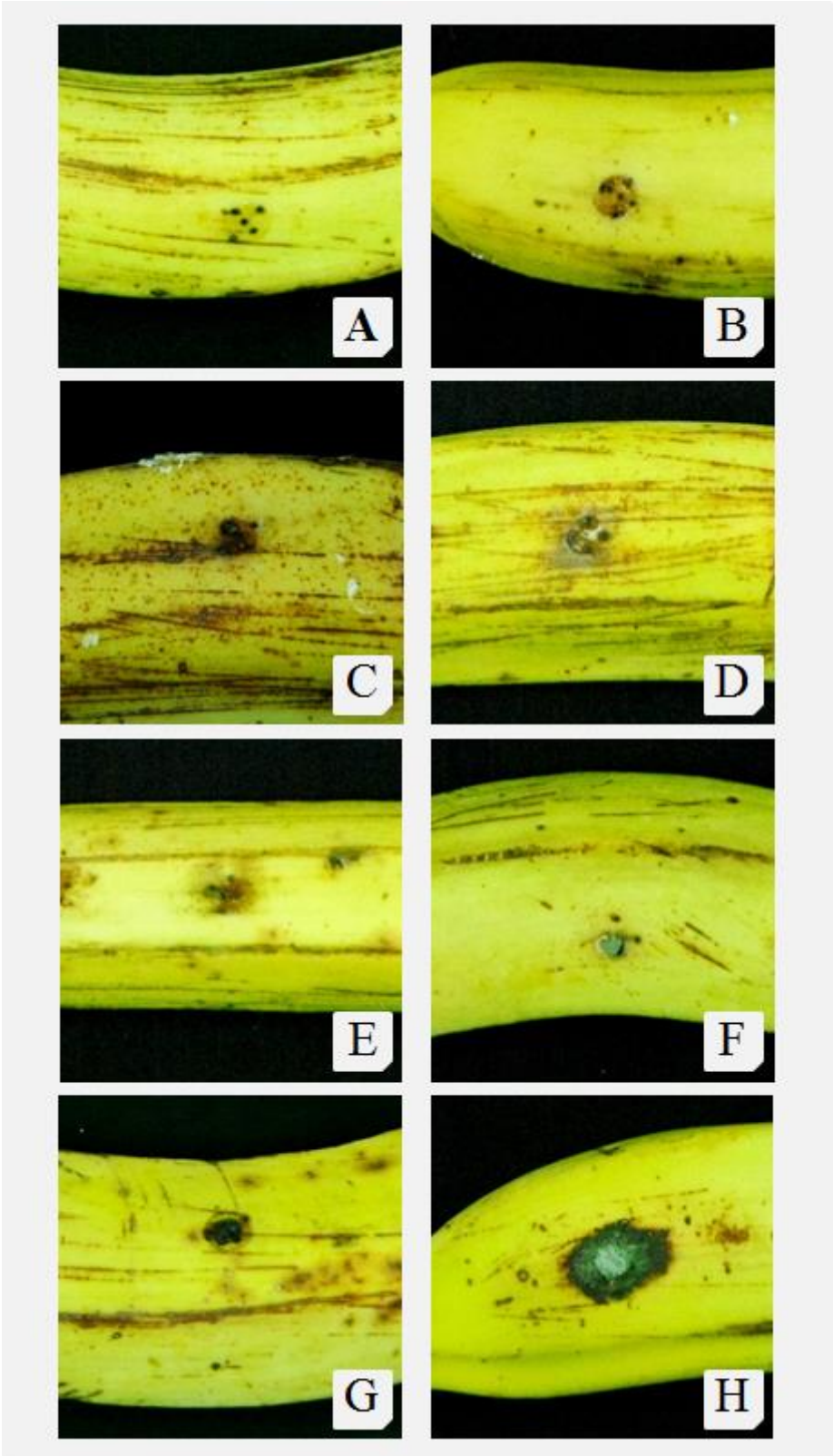
Os resultados apontam *C.g.1* e *C.a.* como não adaptados a *P. lunatus* nem a *Musa* sp., diferente de *C.g.2* que foi patogênico a frutos de *Musa* sp. e, juntamente com CF16, foi mais agressivo a folhas de *P. lunatus* superando *C.t.* fungo comumente relacionado a Fabaceae (Figuras 12 e 14A). É importante salientar o aparente crescimento micelial de *C.a.* restrito à superfície do tecido vegetal usando as reservas contidas no disco de BDA veículo de inoculação, tal dúvida pode ser sanada mediante inoculação usando suspensão conidial como inóculo. A patogenicidade a frutos destacados de *Musa* sp. notada para CF16 e *C.g.2* pode ser um falso positivo devido ao fato de que o disco de BDA contendo micélio foi depositado sobre o látex exsudado do ferimento inicial. Portanto sugere-se que o experimento seja repetido, desta vez controlando essa variável mediante remoção do exsudado antes da inoculação.

Figura 12 – Patogenicidade a folhas de fava inoculados com discos de BDA contendo micélio. A – testemunha, B – *C.g.1*, C – *C.c.*, D – CF16, E – *C.g.2*, F – *C.a.*, G – *C.t.*, H – *C.m.*.



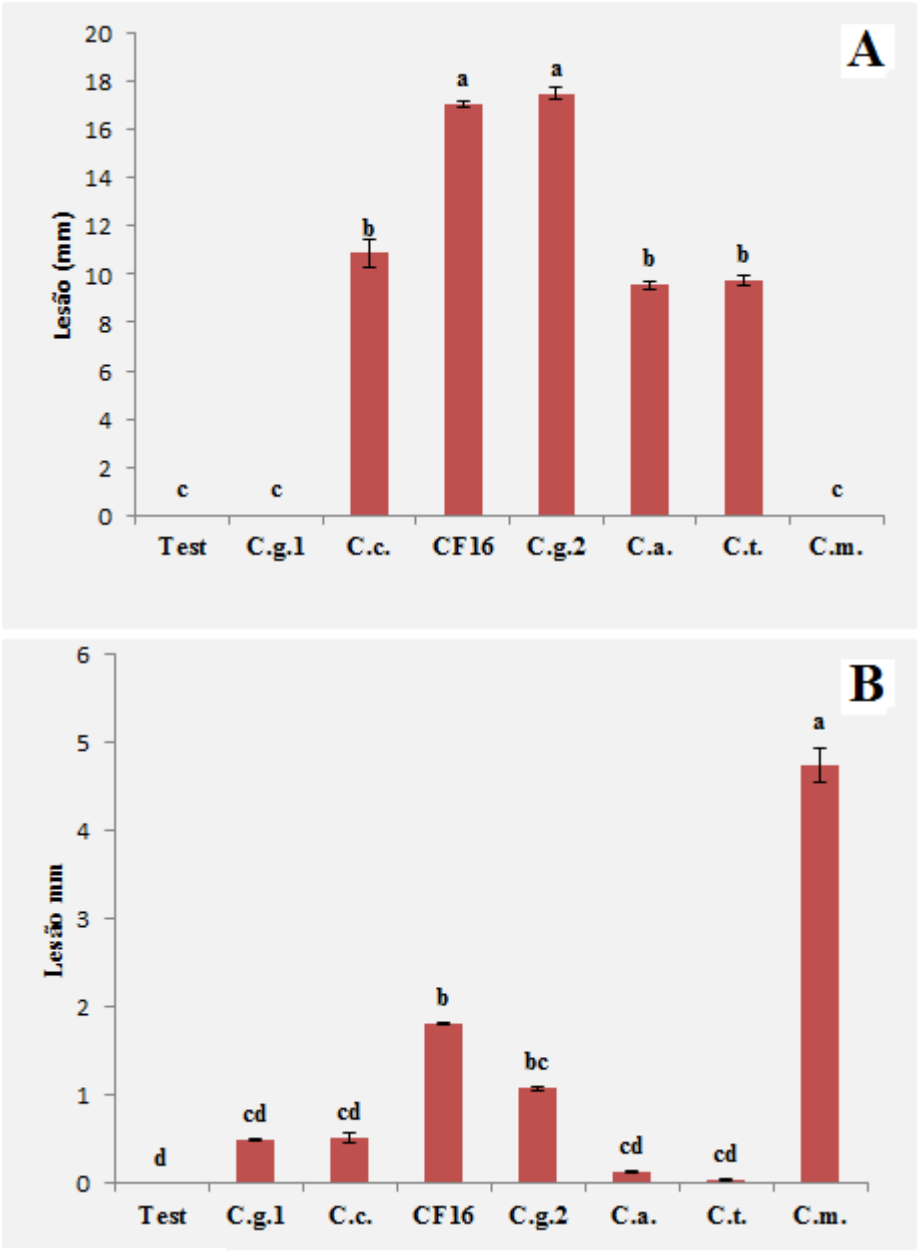
Fonte: AUTOR

Figura 13 - Patogenicidade a frutos de bananeira inoculados com discos de BDA contendo micélio. A – testemunha, B – *C.g.1*, C – *C.c.*, D – CF16, E – *C.g.2*, F – *C.a.*, G – *C.t.*, H – *C.m.*.



Fonte: AUTOR

Figura 14 – Severidade a folhas de *Phaseolus lunatus* e frutos de *Musa* sp. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente no teste de *Tukey* (p < 0.05). A - dms = 3,5 CV% = 15,28. B - dms = 1,04 CV% = 33,63.



Fonte: AUTOR

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na ausência de luz e à temperatura de 25ºC ± 2 objetivando produção de conídios a serem empregados como fonte de inóculo, *C.c.* apresentou melhor desempenho no meio de cultivo BDA. Contudo para a produção de biomassa fúngica para extração de biomoléculas sugere-se empregar o meio Extrato de Malte desprovido de aguar (agente gelificante). No entanto como considerado por Barbosa et al (2002) de maneira geral a adaptação metabólica para aproveitar melhor uma ou outra fonte de carboidrato é bastante variável, incluso entre isolados da mesma espécie, logo testes semelhantes devem ser realizados com o conjunto de isolados que serão usados como modelo biológico afim de eleger o protocolo mais adequado para os objetivos pretendidos.

A caracterização morfológica foi eficiente para todos os isolados exceto para CF16, visto que o mesmo não produziu conídios em placa de Petri até o período de avaliação e as características da colônia não foram suficientes para identificar a espécie.

É notória a necessidade de uma revisão taxonômica de muitas espécies de *Colletotrichum* (HYDE et al., 2009). Paralelamente revisões sistemáticas foram propostas para os maiores complexos de espécies de *Colletotrichum*, tais como *C. acutatum*, *C. boninense* e *C. gloeosporioides* (*lato sensu*) (DAMM et al., 2012). Usando uma abordagem multifásica progressos consideráveis foram feitos na delimitação de espécies desse gênero e muitas novas espécies e designações de epíteto foram reportadas (WEIR; JOHNSTON 2010, WIKEE et al., 2011, YANG et al., 2011). Tais trabalhos podem ser usados como referência na identificação de *C.g.1*, *C.g.2* e *C.a.*.

A proposta de caracterização multifacetada, além da caracterização morfológica; biométrica; fisiológica; bioquímica e baseada em ITS, outros pares de iniciadores para os genes que codificam Actina, Glicerol-3-fostato-dehidrogenase (GPADH) e β-tubulina são empregados para identificar e investigar a relação filogenética entre as espécies de *Colletotrichum*, como feito por Noireung et al. (2012). Portanto sugere-se, além do sequenciamento da região ITS amplificada para cada isolado e da caracterização morfofisiológica, o sequenciamento e análise dos genes Actina, GPADH e β-tubulina dos isolados.

Analisando o comportamento nos testes de patogenicidade a *Solanum lycopersicum*, *Phaseolus lunatus* e *Musa* sp. Na sintomatoloiga CF16 foi semelhante a *C.g.2* exceto sobre folha de *S. lycopersicum* onde CF16 foi mais agressivo que *C.g.2*. Adicionalmente *C.g.2* não amplificou a sequencia de rDNA com os iniciadores ITS 1 e 4 diferentemente de CF16 que

por sua vez não produziu lesões no teste de infiltração com o tratamento BD como foi produzido por *C.g.*

Embora o anelamento diferencial do ITS 1 entre estes isolados fornecer fortes indícios de que trata-se de espécies diferentes, o padrão eletroforético pode ratificar a distinção no nível de espécie dos referidos isolados. A identificação morfológica de *C.g.1* e *C.g.2* como a mesma espécie é ratificada pela não amplificação com ITS 1 e 4. Por outro lado *C.g.2* produziu lesões durante o teste de infiltração e mostrou comportamento menos específico aos hospedeiros e órgãos avaliados nos testes de patogenicidade. Isso pode indicar uma separação deles em subespécies ou em raças fisiológicas distintas.

.

Figura 15 – Quadro-resumo da caracterização multifásica empregada para as espécies de *Colletotrichum* spp

Isolado	Hospedeiro	Identificação		Infiltração		Patogenicidade			
						S. lycopersicum		*P. lunatus*	*Musa* sp.
		Morfocultural	ITS	BD	YCB_{np10}	Folha	Fruto	Folha	Fruto
CF13	*S. lycopersicum*	*C.g.1*	3 e 4	-	-	++	++	-	-
CF15	*S. lycopersicum*	*C.c.*	1 e 4	-	*	+	+++	++	-
CF16	*S. lycopersicum*	-	1 e 4	-	-	+++	+++	+++	+
CF17	*S. lycopersicum*	*C.g.2*	3 e 4	*	-	++	+++	+++	+
JL	*S. gilo*	*C.a.*	1 e 4	-	-	+	++	++	-
WT13	*P. lunatus*	*C.t.*	1 e 4	-	-	-	-	++	-
CM	*Musa* sp.	*C.m.*	1 e 4	-	-	-	-	-	+++

Fonte: AUTOR

As espécies *C.t.* e *C.m*. foram patogênicas somente a *P. lunatus* e *Musa* sp. respectivamente, demonstrando a aptidão destes em servir como modelo de fungo não adaptado a *S. lycopersicum* em estudos de NHR.

O teste de patogenicidade não confirmou a ideia de que *C.c.*, por ter produzido lesões no teste de infiltração com o tratamento pobre YCB_{n10}, seria mais agressivo sobre folha do que sobre fruto. Bem como a ideia de que *C.g.2* seria mais agressivo sobre fruto de *S. lycopersicum*, visto que produziu lesões no teste de infiltração com o tratamento rico BD.

Ademais uma bioprospecção de isolados de *Colletotrichum* patogênicos a outras solanáceas e não patogênicos a fabáceas e musáceas é desejável para, juntamente com os isolados ora estudados aqui, constituir um conjunto de espécimes modelo para estudos de interação com *S. lycopersicum* cv. MicroTom, contribuindo para a elucidação de algumas lacunas ainda existentes no conhecimento dos mecanismos envolvidos na NHR, como também ser utilizadas como ponto de partida para novas soluções na proteção de plantas cultivadas.

6 CONCLUSÃO

Diante dos resultados alcançados neste estudo pode-se apontar que os isolados *C.g.1, C.g.2, C.t* e *C.m.* como espécies de *Colletotrichum* a serem empregadas em conjunto com *S. lycopersicum* cv. MicroTom em estudos de interação e resistência do hospedeiro e do não-hospedeiro, pois *C.g.1* demonstrou ser patógeno específico para *S. lycopersicum*, assim como foram *C.t*. e *C.m.* não-patogênicos.

REFERÊNCIAS

AGRIOS, G.N. **Plant Pathology.** 5. ed. Elsevier, Burlington, 2005.

ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. **Nature.** v.408, p.796–815, 2000.

ARIE, T. et al. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology.** v.24, p.135-147, 2007.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.) ***Colletotrichum*:** biology, pathology and control. CAB International,Wallingford, 1992.

BALDWIN, I.T. et al. Volatile signaling in plant–plant interactions: ‘‘Talking trees’’ in the genomics era. **Science.** v.311, p.812–815, 2006.

BARBOSA, C.C. et al. Crescimento e esporulação de isolados de *Verticillium lecanii* sob diferentes condições nutricionais. **Pesquisa agropecuária brasileira.** v.37, n.6, p.821-829, 2002.

BHADAURIA, V. et al. EST mining identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **BMC Genomics.** v.12, p.327-343, 2011.

BORGES, A., et al. Changes in spatial and temporal gene expression. During incompatible interaction between common bean and anthracnose pathogen. **Journal of Plant Physiology.** v.169, p.1216-1220, 2012.

BOSTOCK, R.M. et al. Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. **European Journal of Plant Pathology.** v.107, p.103–111, 2001.

BRUNS, T.D. et al. Evolutionary relationships within the fungi: analyses of nuclear small subunit rRNA sequences. **Molecular Phylogenetics Evolution.** v.1, p.231–241, 1992.

CAI, L. et al. The need to carry out re-inventory of plant pathogens. **Tropical Plant Pathology.** v.36, n.4, p.205-213, 2011.

_____ et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity.** v.39, p.183–204, 2009.

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

COUTO, E.F.; MENEZES, M. Caracterização fisiomorfológica de isolados de *Colletotrichum musae*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29, p.406-412. 2004.

CROUCH, J.A.; CLARKE, B.B.; HILLMAN, B.I. What is the value of ITS sequence data in *Colletotrichum* systematics and species diagnosis? A case study using the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* group. **Mycologia.** v.101, p.648-656, 2009.

DAMM, U. et al. The *Colletotrichum boninense* species complex. **Studies Mycology.** v.73, p.1–36, 2012.

El OIRDI, M. et al. *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato **The Plant Cell.**. v.23, p.2405–2421, 2011.

EMMANUEL, E.; LEVY, A.A. Tomato mutants as tools for functional genomics. **Current Opinion Plant Biology.** v.5, p.112–117, 2002.

FAN, J.; DOERNER, P. Genetic and molecular basis of nonhost disease resistance: Complex, yes: Silver bullet, no. **Current Opinion Plant Biology.** v.15, p.400-406, 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization (2011) <**http://faostat.fao.org/**> Acesso em 21 mai. 2013

FEYS, B. J.; PARKER, J. E. Interplay of signaling pathways in plant disease resistance. **Trends Genetics.** v.16, p.449-455, 2000.

FREEMAN, S.; HOROWITZ, S.; SHARON, A. Pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum* from strawberry and other plants. **Phytopathology.** v.91, p.986-992, 2001.

GIARETTA, D.R. ITS-rDNA phylogeny of *Colletotrichum* spp. causal agent of apple glomerella leaf spot. **Ciência Rural**. v.40, n.4, p.806-812, 2010.

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

GLAZEBROOK, J. Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*. **Current Opinion Plant Biology.** v.4, p.301–308, 2001.

HARVEY, J.A. et al. Nutritional suitability and ecological relevance of Arabidopsis thaliana and Brassica oleracea as foodplants for the cabbage butterfly, Pieris rapae. **Plant Ecology.** v.189, p.117–126, 2007.

HULBERT, S. H., et al. Resistance gene complexes: Evolution and utilization. **Annual Review of Phytopathology.** v.39, p.285-312, 2001.

HYDE K. D. et al. *Colletotrichum* – names in current use. **Fungal Diversity.** v.39, p.147–182, 2009.

JARAMILLO, V.D.A. et al. Horizontal Transfer of a Subtilisin Gene from Plants into an Ancestor of the Plant Pathogenic Fungal Genus Colletotrichum. **Plos One.** v.8, p.3, 2013.

JONES J. B. et al. (Ed) **Compendium of tomato diseases.** APS, St. Paul, 1991.

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

JAULNEAU, V. et al. Host and Nonhost Resistance in *Medicago–Colletotrichum* Interactions **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v.23, p. 1107–1117, 2010.

KESSLER, A.; HALITSCHKE, R.; BALDWIN, I.T. Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. **Science.** v.305, p.665–668, 2004.

KO KO T.W. et al. The need for re-inventory of Thai phytopathogens. **Chiang Mai Journal of Science.** v.38, p.1-13, 2011.

KUNKEL, B.N.; BROOKS, D.M. Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. **Current Opinion Plant Biology.** v.5, p.325–331, 2002.

LIAO, C.Y. et al. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. **European Journal of Plant Pathology.** v.133, p.599–608, 2012.

LIPKA U, FUCHS R, LIPKA V. *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews **Current Opinion in Plant Biology**. v.11, p.404-411, 2008.

LOBUGLIO, K.F.; PFISTER, D.H. A *Glomerella* species phylogenetically related to ***Colletotrichum acutatum*** on Norway maple in Massachussetts. **Mycologia**, v.100, p.710-715, 2008.

LOPES, C.A.; ÁVILA, A.C. (Org) **Doenças do tomateiro.** Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Embrapa Hortaliças. Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento. 2005.

LU, G. et al. Diversity and molecular relationships of endophytic *Colletotrichum* isolates from the Iwokrama forest reserve, Guyana. **Mycological Research.** v.108, p.53–63, 2004.

MAFACIOLI, R. et al.. Variabilidade patogênica e efeito de carboidratos no crescimento micelial, esporulação e agressividade de *Colletotrichum gloeosporioides* da pupunheira. **Summa Phytopathologica.** v.34, n.1, p.18-21, 2008

MEISSNER, R. et al. A new model system for tomato genetics. **The Plant Journal.** v.12, p.1465–1472, 1997.

MENEZES, M. Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, v.3, p.170-179, 2006.

MORRIS, W.F. et al. Direct and interactive effects of enemies and mutualists on plant performance: A meta-analysis. **Ecology.** v.88, p.1021–1029, 2007.

NOIREUNG, P.; et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morfology and molecular analysis. **Mycologie.**. v.33, n.3, p.347-362, 2012.

O'CONNELL, R.J. et al. Hemibiotrophic infection of Pisum sativum by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology.** v.42, p.774-783, 1993.

OKABE A. et al. Genealogical analysis of *Fusarium oxysporum* isolates from wild *Lycopersicon* spp. in Chile. **Japanese Journal Phytopathology.** v.71, p.218–219, 2005.

PAJEROWSKA, K.M.; PARKER,L.E.; GEBHARDT, C. Potato homologs of Arabidopsis thaliana genes functional in defense signaling-identification, genetic mapping, and molecular cloning. **Molecular Plant-Microbe Interactions.** v.18, n.10, p.1107–1119, 2005.

PATERSON, R.R.M.; BRIDGE, P.D. **Biochemical Techniques for Filamentous Fungi.** Wallingford. C.A.C. International. 125 p., 1994.

PERFECT, S. et al. Colletotrichum: a model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology.** v.27, p.186–198, 1999.

PHOTITA W. et al. Morphological and molecular characterization of *Colletotrichum* species from herbaceous plants in Thailand. **Fungal Diversity.** v.18, p.117–133, 2005.

PROMPUTTHA I. et al. A phylogenetic evaluation of whether endophytes become saprotrophs at host senescence. **Microbial Ecology.** v.53, p.579–590, 2007.

PIETERSE, C.M.J.; DICKE, M. Plant interactions with microbes and insects: from molecular mechanisms to ecology. **Trends in Plant Science.** v.12, n.12, p.564-569, 2007.

REIGNAULT P, SNCHOLLE M. Plant-pathogen interactions: will the understanding of common mechanisms lead to the unification of concepts? **Compte Rendues Biologies**. v.328, p.821-833, 2005.

SCHMIDT, D.D. et al. *Solanum nigrum*: A model ecological expression system and its tools**. Molecular Ecology.** v.13, p.981–995, 2004.

SCOTT, J. W.; HARBAUGH, B.K. Micro-Tom – a miniature dwarf tomato. **Florida Agricultural Experimental Station Circular.** v.370, p.1–6, 1989.

SERRA, I.M.R.S. et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica.** v.37, n.1, p.42-51, 2011.

SIDDIQUI, I. A., SHAUKAT, S. S. Systemic resistance in tomato induced by biocontrol bacteria against the root-knot nematode, *Meloidegyne javanica* is independent of salycilic acid production. **Journal of Phytopathology.** v.152, p.48–54, 2004.

SREENIVASAPRASAD, S. et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry**. Plant Pathology.** v.45, p.650-655, 1996.

SUTTON, B. C. **Coelomycetes –** Fingi Imperfect with pycnidia; acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 1980.

TAKAHASHI, H. et al. Catalog of Micro-Tom tomato responses to common fungal, bacterial, and viral pathogens. **Journal of General Plant Pathology.** v.71, p.8-22, 2005.

THE PHYTOPATHOLOGICAL SOCIETY OF JAPAN. **Common names of plant diseases in Japan.** Japan Plant Protection Association, Tokyo, 2000.

VALUEVA, T.A.; MOSOLOV, V.V. Role of inhibitors of proteolytic enzymes in plant defense against phytopathogenic microorganisms. **Biochemistry.** v.69, n.1, p.1305-1309, 2004.

van LOON, L.C., BAKKER, P.A.H.M., PIETERSE, C.M.J. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. **Annual Review of Phytopathology.** v.36, p.453–483, 1998.

WEIR, B.S., JOHNSTON, P.R. Characterization and neotypification of *Gloeosporium kaki* Hori as *Colletotrichum horii*. **Mycotaxon.** v.111, p.209–219, 2010.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Pages 315-322 in: **PCR Protocols: A Guide to Methods and Application.** M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, and T. J. White, eds. Academic Press, San Diego, CA, 1990.

WIKEE, S. et al. *Colletotrichum* species from Jasmine (*Jasminum sambac*). **Fungal Diversity.** v.46, p.171–182, 2011.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polimorphysms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research.** v.18, p.6531–6535, 1990.

YANG, Y. L. et al. *Colletotrichum* species on Orchidaceae in southwest China. **Cryptogamie Mycologie.** v.32, p.229–253, 2011.

XIAO, C.L., MACKENZIE, S.J., LEGARD, D.E. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* from strawberry and noncultivated hosts. **Phytopathology.** v.94, p.446-453, 2004.