

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

Livoney Barbosa de Oliveira Goes

**EFEITOS DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE  
SECRETOMA DE *COLLETOTRICHUM* spp.**

Rio Largo

2017

LIVONEY BARBOSA DE OLIVEIRA GOES

**EFEITOS DE FONTES DE CARBONO E NITROGÊNIO NA PRODUÇÃO DE  
SECRETOMA DE *COLLETOTRICHUM* spp.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Proteção de Plantas, do Centro de Ciências  
Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas,  
como parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Doutor em Proteção de Plantas.

Rio Largo  
2017

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Janis Christine Angelina Cavalcante

G598e Goes, Livoney Barbosa de Oliveira.  
Efeitos de fontes de carbono e nitrogênio na produção de secretoma de *colletotrichum* spp / Livoney Barbosa de Oliveira Goes. – 2017.  
97 f. : il. color., grafs., tabs.

Orientador: Gildemberg Amorim Leal Júnior.  
Tese (Doutorado em Proteção de Plantas) - Universidade Federal de Alagoas. Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2017.

Bibliografia: f. 97-98.

1. Proteção de plantas. 2. Interação planta-patógeno . 3. Relação C:N. 4. Especificidade ao hospedeiro. I. Título.

CDU: 581.2



UFAL

## Universidade Federal de Alagoas

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROTEÇÃO DE PLANTAS  
CÓDIGO-CAPIES – 26001012029P1



CECA

Aos trinta dias do mês de maio de dois mil e dezessete, na sala de aula do prédio da Pós-Graduação do Centro de Ciências Agrárias da UFAL, sob a Presidência do Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, reuniu-se a Banca Examinadora para Defesa Pública de Tese do Biólogo **Livoney Barbosa de Oliveira Goes**, aluno do Curso de Doutorado em Proteção de Plantas da UFAL, com o título: “**Efeito de fontes de carbono e nitrogênio na produção de secretoma de *Colletotrichum ssp.***”. A Banca examinadora ficou assim constituída: Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior (CECA-UFAL) - Orientador - Membro Titular, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Silva Muniz (CECA-UFAL) - Membro Titular, Prof. Dr. Julio Alves Cardoso Filho (CECA-UFAL) – Membro Titular e a Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marissônia de Araujo Noronha (EMBRAPA) – Membro Suplente. Ocorrências: Abertura pelo Presidente da Banca Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior, que agradeceu a valiosa presença dos demais membros componentes da Banca, manifestando sua satisfação pela defesa da Tese do Curso de Doutorado em Proteção de Plantas da UFAL, desta feita sob sua orientação. A seguir, parabenizou o aluno **Livoney Barbosa de Oliveira Goes** pelo trabalho apresentado. O presidente da Banca Examinadora iniciou os trabalhos passando a palavra à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marissônia de Araujo Noronha e, logo após, foram ouvidos os comentários e análises dos outros componentes da Banca. Terminada a defesa, procedeu-se o julgamento pelos membros examinadores, sendo o candidato **APROVADO**. O candidato foi informado que terá um prazo de sessenta (60) dias para entregar na Coordenação do Curso os exemplares da Tese com as modificações sugeridas pela banca examinadora e apresentar o comprovante de submissão de pelo menos dois artigos extraídos de sua Tese para expedição do Diploma de Doutor em Proteção de Plantas. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos Senhores Membros da Banca Examinadora e por mim, Maxwell Maclon Silva Guilherme, Secretário. Rio Largo (AL), 30 de maio de 2017.

Prof. Dr. Gildemberg Amorim Leal Junior  
Presidente Titular

Prof. Dr. Julio Alves Cardoso Filho  
Membro Titular

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria de Fátima Silva Muniz  
Membro Titular

Prof. Dr. Marissônia de Araujo Noronha  
Membro Suplente

Livoney Barbosa de Oliveira Goes  
Biólogo

Maxwell Maclon Silva Guilherme  
Secretário

## RESUMO

O presente estudo investigou o efeito da limitação de carbono e nitrogênio nas lesões foliares causadas pelo secretoma de fungos fitopatogênicos. Três espécies de *Colletotrichum* e seus mutantes nit foram cultivadas com suplementação de carbono 10g/L (dextrose, sacarose, amido e sorbitol) e de nitrogênio 1g/L (molibdato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de potássio, L-asparagina e extrato de levedura). O objetivo foi identificar quais fontes e combinações causam estresse fisiológico. Foram mensurados o diâmetro das colônias, a produção de esporos, a massa fresca, seca e sua variação, a variação de pH e a produção de proteínas e lesões foliares. Foi possível observar que sacarose e fontes inorgânicas de nitrogênio causaram estresse nutricional nos isolados fúngicos, sobretudo a associação sorbitol e nitrato de potássio que melhor simula o estresse nutricional enfrentado nas fases iniciais de infecção. O hospedeiro *Sl* exibiu maior e mais diversa reação ao secretoma. Nos mutantes nit observou-se que sorbitol e extrato de levedura proporcionaram os menores estresses fisiológicos e a maior diversidade de lesões foliares em *Sl*. Portanto o estresse nutricional contribui para o potencial lesivo e para a inespecificidade ao hospedeiro, nas espécies de *Colletotrichum* utilizadas nesse estudo, assim como para os seus mutantes nit. Contudo o estresse nutricional também evidenciou o desempenho superior dos mutantes nit em utilizar fontes de nitrogênio alternativas ao nitrato, quando comparados aos Tipos selvagens.

**Palavras-chave:** interação planta-patógeno; relação C:N, especificidade ao hospedeiro.

## ABSTRACT

The present study investigated the effect of carbon and nitrogen limitation on foliar lesions caused by the secretoma of phytopathogenic fungi. Three species of *Colletotrichum* and their nit mutants were cultured with 10g / L carbon supplementation (dextrose, sucrose, starch and sorbitol) and 1g / L nitrogen (ammonium molybdate, ammonium chloride, potassium nitrate, L-asparagine and extract of yeast). The aim was to identify which sources and combinations cause physiological stress. The diameter of the colonies, spore production, fresh mass, dry matter and its variation, pH variation and leaf protein and lesion production were measured. It was possible to observe that sucrose and inorganic sources of nitrogen caused nutritional stress in fungal isolates, especially the association of sorbitol and potassium nitrate, which best simulates the nutritional stress encountered in the initial stages of infection. The host SI exhibited a larger and more diverse reaction to the secretoma. In the nit mutants it was observed that sorbitol and yeast extract provided the lowest physiological stresses and the greatest diversity of leaf lesions in SI. Therefore nutritional stress contributes to the potential harmful and non-specific host, in the *Colletotrichum* species used in this study, as well as to its nit mutants. However, nutritional stress also evidenced the superior performance of nit mutants in using nitrogen sources that were alternative to nitrate when compared to wild types.

**Keywords:** plant-pathogen interaction; C: N ratio, host specificity.

## LISTA DE TABELAS

Tabela	Título	Página
1	Identificação molecular dos isolados de <i>Colletotrichum</i> empregados no estudo.	34
2	Diâmetro médio (cm) das colônias de espécies de <i>Colletotrichum</i> sete dias após inoculação sob estresse nutricional de carbono.	36
3	Massa fresca (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.	37
4	Massa seca (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.	38
5	Variação de massa (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.	38
6	Variação de pH do secretoma de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.	39
7	Produção de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.	40
8	Diâmetro médio (cm) das colônias de <i>Colletotrichum</i> cinco dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	44
9	Esporulação média $10^5$ esporos/mL de espécies de <i>Colletotrichum</i> dez dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	45
10	Massa fresca (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	47
11	Massa seca (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	48
12	Variação de massa (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	48
13	Esporulação média $10^5$ esporos/mL de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	49
14	Variação de pH do secretoma de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	50
15	Produção de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.	51
16	Diâmetro médio (cm) das colônias de <i>Colletotrichum</i> cinco dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	53
17	Esporulação média $10^5$ esporos/mL de espécies de <i>Colletotrichum</i> dez dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	54
18	Massa fresca (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	56

19	Massa seca (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	56
20	Variação de massa (g) de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	57
21	Esporulação média $10^5$ esporos/mL de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	58
22	Variação de pH do secretoma de espécies de <i>Colletotrichum</i> 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.	59
23	Produção de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) na combinação de sorbitol com fontes de nitrogênio.	59
24	Diâmetro médio das colônias de isolados selvagens e mutantes de <i>Colletotrichum</i> em $\text{KClO}_3$ 150mM aos sete dias de cultivo.	82
25	Produção de massa fresca (g) por isolados selvagens e mutantes de <i>Colletotrichum</i> aos 21 dias de cultivo.	83
26	Produção de massa seca (g) por isolados selvagens e mutantes de <i>Colletotrichum</i> aos 21 dias de cultivo.	84
27	Variação de massa (g) em isolados selvagens e mutantes de <i>Colletotrichum</i> aos 21 dias de cultivo.	86
28	Esporulação média $10^5$ esporos/mL em isolados selvagens e mutantes de <i>Colletotrichum</i> aos 21 dias de cultivo.	87
29	Variação de pH do secretoma em isolados selvagens e mutantes de <i>Colletotrichum</i> aos 21 dias de cultivo.	88

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Face abaxial das folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> (A) e <i>Phaseolus lunatus</i> (B) perfundida venalmente com agulha e seringa.	33
2	Teste de patogenicidade. Da esquerda para a direita Cs, Ct e Cm. Folhas de <i>Solanum lycopersicum</i> (A-C) e folhas de <i>Phaseolus lunatus</i> (D-F).	35
3	Lesões em folhas de <i>S. lycopersicum</i> e de <i>P. lunatus</i> causadas pela infiltração com secretomas de <i>C. siamense</i> , <i>C. truncatum</i> e <i>C. musae</i> cultivados em meio contendo dextrose como fonte de carbono. <i>S. lycopersicum</i> (A-D); <i>P. lunatus</i> (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).	41
4	Lesões em folhas de <i>S. lycopersicum</i> e de <i>P. lunatus</i> causadas pela infiltração com secretomas de <i>C. siamense</i> , <i>C. truncatum</i> e <i>C. musae</i> cultivados em meio contendo sacarose como fonte de carbono. <i>S. lycopersicum</i> (A-D); <i>P. lunatus</i> (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).	41
5	Lesões em folhas de <i>S. lycopersicum</i> e de <i>P. lunatus</i> causadas pela infiltração com secretomas de <i>C. siamense</i> , <i>C. truncatum</i> e <i>C. musae</i> cultivados em meio contendo amido como fonte de carbono. <i>S. lycopersicum</i> (A-D); <i>P. lunatus</i> (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).	43
6	Lesões em folhas de <i>S. lycopersicum</i> e de <i>P. lunatus</i> causadas pela infiltração com secretomas de <i>C. siamense</i> , <i>C. truncatum</i> e <i>C. musae</i> cultivados em meio contendo sorbitol como fonte de carbono. <i>S. lycopersicum</i> (A-D); <i>P. lunatus</i> (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).	43
7	Crescimento micelial aos 5dai em sacarose sob estresse de fontes de nitrogênio. Nas linhas da esquerda para a direita Cs, Ct e Cm respectivamente. A-C Molibdato de amônio, D-F Cloreto de amônio, G-I Nitrato de potássio, J-M Asparagina, N-P Extrato de levedura.	46
8	Lesões induzidas em folhas de <i>S. lycopersicum</i> perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sacarose. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, Cs, Ct e Cm. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura.	52
9	Lesões induzidas em folhas de <i>P. lunatus</i> perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sacarose. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, Cs, Ct e Cm. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura.	52
10	Crescimento micelial aos 5dai em sorbitol sob estresse de fontes de nitrogênio. Nas linhas da esquerda para a direita Cs, Ct e Cm respectivamente. A-C Molibdato de amônio, D-F Cloreto de amônio, G-I Nitrato de potássio, J-M Asparagina, N-P Extrato de levedura.	55

- 11 Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sorbitol. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, Cs, Ct e Cm. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura. 61
- 12 Lesões induzidas em folhas de *P. lunatus* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sorbitol. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, Cs, Ct e Cm. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura. 61
- 13 Crescimento micelial de isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* em KClO<sub>3</sub> 150mM e batata 10/L aos 30dai. A – Cs, B – CsM1, C – CsM2, D – Ct, E – CtM1, F – CtM2, G – Cm, H – CmM1, I – CmM2. 81
- 14 Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam nitrato de potássio (A-J) e extrato de levedura (L-U) em sacarose. A e L - Controles, B e M – Cs, C e N – CsM1, D e O CsM2, E e P – Ct, F e Q – CtM1, G e R – CtM2, H e S – Cm, I e T – CmM1, J e U – CmM2. 91
- 15 Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam nitrato de potássio (A-J) e extrato de levedura (L-U) em sorbitol. A e L - Controles, B e M – Cs, C e N – CsM1, D e O CsM2, E e P – Ct, F e Q – CtM1, G e R – CtM2, H e S – Cm, I e T – CmM1, J e U – CmM2. 91
- 16 Lesões induzidas em folhas de *Phaseolus lunatus* perfundidas com nitrato de potássio (A-D e I) e extrato de levedura (E-H e J-L) respectivamente em sacarose e sorbitol. A, E, I, J - Controles, B – CsM2, C e G – Ct, D e L - CmM2, F – CsM1, H – CmM1. 92

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	8
2	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	10
2.1	Considerações sobre <i>Colletotrichum</i> spp. ....	11
2.2	Fatores de virulência .....	12
2.3	Fisiologia e estresse nutricional em fungos .....	14
2.4	Considerações finais .....	18
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	19
3	<b>Reação dos tecidos de <i>Solanum lycopersicum</i> e <i>Phaseolus lunatus</i> ao secretoma de <i>Colletotrichum</i> spp. produzido em diferentes condições nutricionais.</b> .....	27
3.1	<b>Introdução</b> .....	29
3.2	<b>Metodologia</b> .....	30
3.2.1	Delineamento experimental e análise estatística .....	33
3.3	<b>Resultados</b> .....	34
3.3.1	Estresse nutricional de fontes de carbono em meio sólido .....	36
3.3.2	Estresse nutricional de fontes de carbono em meio líquido.....	37
3.3.3	Lesão tecidual sob estresse de fontes de carbono .....	40
3.3.4	Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose no meio sólido .....	44
3.3.5	Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose no meio líquido .....	47
3.3.6	Lesão tecidual sob estresse de fontes de nitrogênio em sacarose .....	51
3.3.7	Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol no meio sólido .....	53
3.3.8	Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol no meio líquido .....	54
3.3.9	Lesão tecidual sob estresse de fontes de nitrogênio em sorbitol .....	60
3.4	<b>Discussão</b> .....	62
3.5	<b>Conclusões</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
4	<b>Reação dos tecidos de <i>Solanum lycopersicum</i> E <i>Phaseolus lunatus</i> ao secretoma de mutantes nit de <i>Colletotrichum</i> spp. produzidos em estresse nutricional</b> .....	75
4.1	<b>Introdução</b> .....	77
4.2	<b>Metodologia</b> .....	79
4.2.1	Estresse nutricional .....	79
4.2.2	Condições de crescimento e variáveis analisadas .....	79
4.2.3	Delineamento experimental e análise estatística .....	80
4.3	<b>Resultados</b> .....	80
4.3.1	Obtenção de mutantes Nit .....	80
4.3.2	Estresse nutricional .....	82
4.3.3	Lesões teciduais .....	89
4.4	<b>Discussão</b> .....	93
4.5	<b>Conclusões</b> .....	96
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

Os fungos surgiram primeiro que as plantas e a interação entre ambos só se deu com o surgimento de plantas vasculares terrestres (FIELD et al., 2012; HUMPHREYS et al., 2010). Os vegetais tiveram sua adaptação ao ambiente terrestre facilitada pelos fungos à medida que, em interação simbiótica, os fungos promoviam o crescimento e desenvolvimento dos vegetais (REDECKER et al., 2000; ZEILINGER et al., 2015).

Nessas interações benéficas, os fungos dispunham das reservas de carbono dos vegetais, enquanto facilitavam a absorção de sais minerais e água do solo (BUSCOT et al., 2000). Contudo, as interações maléficas que geravam instabilidade no vegetal, exerciam sobre eles pressão de seleção levando-os à evolução (JONES; DANGL, 2006). Decorridos mais de 400 milhões de anos de coevolução, a interação entre plantas e fungos tornou-se complexa e produziu resultados diversos, desde a mineralização e consequente disposição da matéria orgânica ao vegetal até a patogênese (KEMEN; JONES, 2012).

Na interação com a planta os fungos podem desequilibrar o benefício mútuo adotando as formas de colonização biotrófica, hemibiotrófica e necrotrófica, contudo os limites de desequilíbrio não são bem conhecidos (GARDINER et al., 2013), podendo um mesmo fungo ter características de colonização diferentes de acordo com o hospedeiro ou ainda mudar essa característica conforme a fase de infecção.

Fungos fitopatogênicos dispõem de um amplo arsenal molecular extracelulares. Algumas dessas moléculas são enzimas hidrolíticas que catabolizam a parede celular vegetal facilitando assim a penetração e a maceração dos tecidos (AMARAL et al., 2012; JARAMILLO et al., 2013; TYLER et al., 2006).

Outras são pequenas demais para desempenhar atividade catalítica, estas podem então atuar como PAMP's (*pathogen associated molecular patterns*) e desencadear resposta de defesa no vegetal, ou ainda como efetores neutralizando, suprimindo e/ou conspurcando o sistema imune vegetal (AMARAL et al., 2012; BENT; MACKKEY, 2007; JARAMILLO et al., 2013).

Os padrões moleculares relacionados à defesa vegetal são desencadeados pela interação entre moléculas do fungo e receptores vegetais, e determinam o tipo de relação a ser estabelecida (ZEILINGER et al., 2015).

Diferentemente das condições artificiais de laboratório, na natureza os fitopatógenos sofrem restrições na disponibilidade de carbono e nitrogênio nas primeiras fases da colonização, tais restrições alteram sua fisiologia e podem afetar a comunicação bioquímica com o hospedeiro e o estabelecimento da relação típica.

O gênero *Colletotrichum* infecta em pré e pós-colheita várias plantas cultivadas de importância econômica. Contudo esses fungos exibem um conjunto bem mais amplo de hábitos, tais como saprobiose, endo e epifitía (KUMAR; HYDE, 2004; LIU et al., 2007; PRIHASTUTI et al., 2009). Existem espécies patogênicas generalistas como também adaptadas a hospedeiros e famílias botânicas específicas (HYDE et al., 2009). O hábito hemibiotrófico de algumas espécies de *Colletotrichum* já foi bem relatado, incluso os sinais moleculares que desencadeiam a mudança entre as fases biotrófica e necrotrófica da infecção (GAN et al., 2013; MÜCH et al., 2008).

O objetivo foi inferir sobre os efeitos do estresse nutricional na fisiologia de *Colletotrichum* spp. e nos sintomas gerados nos tecidos hospedeiro e não-hospedeiro.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Os vegetais hospedam um ou mais fungos endofíticos com a finalidade de aumentar a resistência a patógenos, herbívoros e/ou a estresses (STROBEL; DAISY, 2003). Esses microrganismos desenvolveram estratégias para suprimir ou conspurcar a defesa vegetal, permitindo-lhes colonizar a superfície ou o interior do hospedeiro, mesmo seguindo padrões e estruturas de colonização semelhantes aos patogênicos (CORRADI; BONFANTE, 2012; ZAMIOUDIS; PIETERSE, 2012).

Os ferimentos e estômatos são aberturas pelas quais os fungos acessam o interior vegetal, contudo enzimas que degradam a parede celular (CWDEs *cell wall-degrading enzymes*) e estruturas específicas de penetração podem ser usadas para tal fim.

Os fungos necrotróficos causam rápidos danos ao tecido infectado ao combinar CWDEs, espécies reativas de oxigênio (ROS *reactive oxygen species*) e/ou toxinas, logo a virulência de muitos patógenos está correlacionada com esses fatores (WANG et al., 2014). De forma contrária são os fungos biotróficos, enquanto parasitas obrigatórios não produzem toxinas, mas sim efetores que vão suprimir a imunidade vegetal (PERFECT; GREEN, 2001). Esses fungos colonizam hospedeiros específicos, com os quais interagem por meio de hifas biotróficas especializadas em uma zona interfacial onde ambos, fungo e hospedeiro, secretam biomoléculas (YI; VALENT, 2013).

Os fungos hemibiotróficos tem uma estratégia de colonização intermediária, inicialmente comportam-se como biotróficos e depois mudam para necrotróficos (GARDINER et al., 2013). Os fatores fisiológicos e moleculares que desencadeiam essa transição de estilos de colonização ainda não são claros. Alguns hemibiotróficos requerem longos períodos de colonização biotrófica para estabelecer uma infecção, enquanto outros requerem apenas algumas horas (KABBAGE et al., 2015). Especula-se que a fase biotrófica necessita de tempo para impedir a defesa vegetal e suprimir a morte celular programada ou então, uma vez que o limite de defesa seja atingido o patógeno detecte que a biotrofia não é mais vantajosa. Assim a doença inicia-se e a pressão de defesa do hospedeiro desencadeia a transição para necrotrofia, em certos momentos a morte da célula hospedeira pode ser apenas o resultado da reação de defesa do vegetal e não a mudança para necrotrofia transitada. É possível que tanto a manutenção quanto a duração do estágio biotrófico não dependa de como o fungo gerencia as barreiras de defesa vegetal, mas sim de uma exigência para a melhor nutrição fúngica (ZEILINGER et al., 2015; KABBAGE et al., 2015).

As plantas reagem à infecções com mudanças fisiológicas na respiração, fotossíntese, translocação de nutrientes, transpiração e crescimento, e muitas dessas reações estão associadas ao metabolismo primário do carbono (BERGER et al., 2007). Na natureza as plantas são resistentes à maioria dos fungos, pois possuem mecanismos de defesa e o ambiente é heterogêneo, logo as associações simbióticas e neutras são mais frequentes que as parasitárias (STASKAWICZ, 2001). Contudo, nos agroecossistemas, as características de homogeneidade das plantas e do ambiente favorecem a prevalência dos parasitas.

### **2.1. Considerações sobre *Colletotrichum* spp.**

O gênero *Colletotrichum* engloba tanto espécies de fungos fitopatogênicos cosmopolitas que causam antracnose em plantas de interesse econômico, como também espécies endofíticas em plantas tropicais (CANNON; SIMMONS, 2002; SURYANARAYANAN et al., 2002).

As espécies endofíticas colonizam os tecidos vegetais vivos sem causar sintomas de doença (PETRINI, 1991). No entanto muitas espécies endofíticas são relatadas como patógenos biotróficos e necrotróficos em outros hospedeiros (DELAYE et al, 2013).

Segundo O'Connell et al. (2012) a infecção por *Colletotrichum* spp. se dá pela diferenciação de células especializadas responsáveis pela penetração, crescimento no tecido vegetal vivo (estratégia biotrófica) e destruição tecidual (estratégia necrotrófica).

As proteínas extracelulares atuam em todas as estratégias nutricionais desde as fases iniciais da patogênese, por exemplo, Kleemann *et al.* (2008) investigando a biblioteca de cDNA preparada a partir de apressórios maduros de *Colletotrichum higginsianum* crescidos *in vitro*, identificaram 26 proteínas solúveis secretadas com provável atuação no processo infeccioso. Outras proteínas evitam a morte celular por Resposta de Hipersensibilidade (RH) durante a fase biotrófica da infecção, é o caso do efector CgDN3 de *Colletotrichum gloeosporioides*, essencial para a patogenicidade sobre *Stylosanthes guianensis* (STEPHENSON *et al.*, 2000).

Algumas cutinases, pectinases e celulases em *Colletotrichum* spp. foram identificadas e caracterizadas, além da sua regulação e genética moleculares esclarecidas (LIMA FILHO et al., 2003) no entanto a necessidade dessas ECP's no processo de infecção é controverso. De modo geral proteinases extracelulares são fatores significantes de patogênese e virulência de *Colletotrichum*, por exemplo, *C. coccodes*, que mediante mutagênese para proteinases passou de um patógeno virulento a um endofítico não-patogênico (REDMAN; RODRIGUEZ, 2002).

Em condições de limitação de nutrientes o glicerol, necessário à formação e funcionamento do apressório de *Colletotrichum* spp., é produzido a partir do catabolismo de lipídeos, ácidos graxos, glicogênio e trealose e ativação do ciclo do glioxilato (BROWN et al.,

2008; FOSTER et al., 2003; THINES et al., 2000; WANG et al., 2011). A presença de uma fonte de nitrogênio parece ser um importante regulador da expressão de fatores de virulência para *C. gloeosporioides* (MIYARA et al., 2008), a secreção de pectato liase nesse microrganismo é um bom exemplo de como a disponibilidade de nitrogênio e o pH do ambiente estão intimamente relacionados a esse fator de virulência (DRORI et al., 2003).

Alguns estudos, com diferentes propósitos (JACKSON; BOTHAST, 1990; PATEL; GUPTE, 2016) dedicaram-se a estabelecer condições ótimas para o crescimento e a esporulação de espécies de *Colletotrichum* e outros fungos em meio de cultivo líquido e sólido, ou seja, nutrir o fungo de forma a que o mesmo expresse todo seu potencial fisiológico, incluso a produção de ECP's. Os autores demonstraram a importância da relação C:N nos eventos de crescimento e esporulação. Ao passo que meios de cultivo com grandes quantidade de carbono promovem o abundante crescimento micelial e induzem a formação de microesclerócios, concentrações menores de carbono combinadas com fontes complexas e orgânicas de nitrogênio incrementam a esporulação de *Colletotrichum* sp.

Em fungos, tais como os do gênero *Colletotrichum*, o déficit nutricional de nitrogênio estimula a sincronia no desenvolvimento pré-infectivo (HOROWITZ et al., 2006), a expressão de genes que afetam a formação e diferenciação de apressórios (SOANES et al., 2002) e outros determinantes de virulência como enzimas antioxidantes e degradadoras de parede celular.

O acúmulo de amônio nos tecidos vegetais tem sido apontado como um forte contribuinte para a patogenicidade de *Colletotrichum* devido a ativação de fatores de patogenicidade como a secreção de pectato liase (KRAMER-HAIMOVICH et al., 2006). Assim a alcalinização decorrente do acúmulo de amônio é crucial para uma transição bem-sucedida da fase quiescente para a fase de colonização ativa, embora ainda faltem as evidências (ALKAN et al., 2008).

## **2.2. Fatores de virulência**

Os fungos produzem uma diversidade de proteínas extracelulares que atuam tanto no apoplasto, onde podem interferir nos processos de defesa do hospedeiro inibindo proteases vegetais e enzimas líticas, quanto no simplasto interrompendo a rota de transdução de sinal que media as respostas de defesa vegetal (BHADAURIA et al., 2011). As proteínas extracelulares são chamadas de fatores de virulência dada sua importância para o sucesso da colonização e, principalmente, pela produção das lesões típicas da doença.

A interação bioquímica entre planta e patógenos pode ser entendida coevolutiveamente, onde o patógeno desenvolve estratégias para colonizar com sucesso seus hospedeiros, e as plantas elaboram métodos de detecção e defesa para repelir os ataques. O conjunto de

ferramentas morfológicas e bioquímicas usado pelos fungos no desenvolvimento das suas relações com as plantas hospedeiras evoluiu no sentido de incluir mecanismos complexos que fornecem vantagens no controle dos mecanismos de defesa do hospedeiro (ZEILINGER et al., 2015).

O resultado dessa interação pode ser alterado por mutações nos genes do patógeno ou do hospedeiro, assim um vegetal resistente pode tornar-se suscetível ou vice-versa (GIRALDO; VALENT, 2013). Dada sua importância para o sucesso da colonização as biomoléculas extracelulares dos patógenos são chamadas de fatores de virulência.

Nesse sentido, importantes avanços foram feitos na microscopia com o desenvolvimento de técnicas para acompanhar o trânsito tridimensional de moléculas em tempo real dentro das células e tecidos. Técnicas de complementação de biomoléculas por sondas fluorescentes já foram empregadas com sucesso na investigação da cinética de conjugados proteicos da interação planta-patógeno (HAYWARD et al., 2010; HOFF; KÜCK, 2005; HOWARD, 2001; ISHIKAWA-ANKERHOLD et al., 2012).

A pesquisa por proteínas extracelulares (ECP's) na interação fungos fitopatogênicos e seus hospedeiros é um exemplo onde a combinação de diferentes técnicas e abordagens metodológicas resultam em importantes contribuições para o entendimento do processo biológico. Essas proteínas abrangem uma diversidade de enzimas hidrolíticas degradadoras de moléculas complexas ricas em carbono ou nitrogênio da parede celular vegetal, assim fitopatógenos produtores de ECP's facilitam sua penetração e maceração dos tecidos do hospedeiro (AMARAL et al., 2012; JARAMILLO, 2013; TYLER *et al.*, 2006).

No entanto algumas ECP's são pequenas demais para desempenhar atividade catalítica, estas podem então atuar como PAMP's (*pathogen associated molecular patterns*) e desencadear resposta de defesa no vegetal ou ainda como efetores neutralizando, suprimindo e/ou mascarando o sistema imune vegetal (AMARAL et al., 2012; BENT; MACKEY, 2007; JARAMILLO, 2013).

Muitos autores tem se dedicado a identificar e caracterizar ECP's no secretoma, *in vivo*, *in vitro* e *in silico*, de fungos fitopatogênicos tais como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium graminearum* e *Ustilagos maydis* apontando quais possivelmente são fatores de virulência (FERNÁNDEZ-ACERO et al., 2010; LU et al., 2010; MEDINA et al., 2005; MONTANINI et al., 2006; MUELLER et al., 2008; PHALIP et al., 2005).

### 2.3. Fisiologia e estresse nutricional em fungos

Mudanças fisiológicas são observadas no vegetal hospedeiro infectado por fitopatógenos. A respiração é um dos primeiros processos a ser afetado, há o incremento da atividade de enzimas envolvidas na respiração, acúmulo de substâncias fenólicas e aumento no metabolismo de pentoses (SHARMA, 2004).

Os tomateiros atacados pelo fungo necrotrófico *Botrytis cinerea* mostram uma regulação coordenada entre defesa e metabolismo de carboidratos, observa-se correlação entre a magnitude da regulação gênica e o desenvolvimento de sintomas (BERGER et al., 2004). Adicionalmente o ataque de patógenos biotróficos gera uma redução do metabolismo no local infectado, isso resulta em uma mudança nos padrões de translocação de nutrientes que são trazidos às folhas infectadas com a finalidade de suprir as necessidades do patógeno (ZEILINGER et al., 2015).

Nos estágios iniciais de infecção os fitopatógenos ainda não acessam os nutrientes contidos no hospedeiro (SNOEIJER et al., 2000), essa indisponibilidade somada ao tipo de fonte e a concentração dos nutrientes, em especial carbono e nitrogênio, alteram a produção de enzimas e por conseguinte o proteoma extracelular (JUN et al., 2013; MAJEAU et al., 2010). Por exemplo, a regulação, transcricional e dependente da fonte de carbono, da produção de enzimas em *Trichoderma reesei* e *Aspergillus niger* (JUHASZ et al., 2005; STRICKER et al., 2008).

Enzimas degradadoras de fontes de carbono e nitrogênio, muitas vezes, são capazes de produzir sintomas característicos das doenças, como observado por Talbot et al. (1997) estudando os produtos de secreção de *Magnaporthe grisea* sob estresse de nitrogênio. Uma forma de estimular a produção de ECP's *in vitro* é simular as condições enfrentadas pelo fitopatógeno nas fases iniciais da infecção. Tal procedimento tem ajudado a entender melhor o processo de patogênese fúngica nos estágios iniciais da infecção (CHU et al., 2015).

Considerando que a disponibilidade, a fonte e a concentração de carbono afetam a produção de enzimas (MAJEAU et al., 2010) e o metabolismo secundário em fungos, esses fatores devem ser cuidadosamente ajustados para a produção de ECP's em estudos de exoproteoma. Por exemplo, em *Trichoderma reesi* a transcrição dos principais genes de celulases é induzida não somente pela presença da celulose, mas também por uma gama de mono e dissacarídeos como a xilose, lactose e celobiose (NOGAWA et al., 2001; SALOHEIMO et al., 1997), no entanto a indução dessas enzimas é diminuída na presença de uma fonte preferencial de carbono, como por exemplo a glicose e a frutose.

A preferência pelo consumo de fontes de carbono mais simples, que não necessitam de incremento na transcrição de ECP's para seu aproveitamento, enseja evita-las na formulação dos cultivos destinados à pesquisa de ECP's, pois, diferente das condições padrões em laboratório, a disponibilidade de carbono sob a forma de glicose é limitada no habitat dos fitopatógenos.

Muito é conhecido sobre a expressão de genes de *Saccharomyces cerevisiae* sob limitação de glicose (BOER et al., 2003; DARAN-LAPUJADE et al., 2004; WU et al., 2004), porém pouco é publicado sobre mudanças no proteoma durante esse estresse (KROLL et al., 2014).

Cerca de 21 proteínas são diferencialmente reguladas em *S. cerevisiae* para adapta-la a concentrações tanto superiores quanto inferiores a 2% de glicose (GUIDI et al., 2010). Os autores observaram que em concentrações superiores houve aumento na abundância de proteínas envolvidas na gliconeogênese, na fermentação alcoólica e na biossíntese de glicerol. Contudo em níveis baixos de glicose foram mais abundantes as proteínas envolvidas na respiração e no metabolismo de aminoácidos. Houve também incremento na expressão do antioxidante peroxirredoxina TSA1 em ambas as situações. Em suma o estudo demonstrou que o excesso de glicose ocasiona estresse osmótico e oxidativo, ao passo que a restrição de glicose tem mais efeitos benéficos sobre o crescimento e metabolismo de *S. cerevisiae*.

Em estudo semelhante, porém com abordagem proteômica, Kolkman et al. (2006) verificaram que quando a disponibilidade de glicose é limitada há o aumento da quantidade de proteínas envolvidas com a glicólise, ciclo do TCA, fosforilação oxidativa e biogênese de peroxissomos. Este último aponta para a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos pois ambos, biogênese de peroxissomos e oxidação de ácidos graxos são regulados pela via do ativador repressível por glicose Ard1p (GURVITZ et al., 2001).

O trabalho de Kolkman et al. (2006) também relatou que o aumento das quantidades da aldeido-desidrogenase, AldA ocorria durante a ausência de glicose o que indica para a ativação da via de utilização do etanol (alc). Essa via é induzida pelo fator de transcrição AlcR que é regulado pelo repressor catabólico CreA (FELENBOK, 1991; FLIPPHI et al., 2003). Na presença de glicose, CreA reprime AlcR, portanto quando não há glicose o catabolismo de etanol é ativado.

A limitação em nitrogênio é tão impactante sobre a fisiologia dos fungos quanto a restrição de carbono e constitui um importante estímulo para a expressão de virulência em fitopatógenos. O nitrogênio requerido para o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos vem inteiramente do hospedeiro sob a forma de íons nitrato, amônio e aminoácidos (MUR et al., 2016). Alguns trabalhos sugerem que as fontes de nitrogênio na planta são limitadas e que essa

restrição desencadeia o desenvolvimento da doença controlando a expressão de genes de patogenicidade (LÓPEZ-BERGES et al., 2010; THOMMA et al., 2006). No entanto, outros estudos sugerem que as quantidade de nitrogênio no tecido vegetal são suficientes para o pleno desenvolvimento do fungo (PAGEAU et al., 2006; SOLOMON et al., 2003; TAVERNIER et al., 2007; WALTERS; BINGHAM, 2007).

No apoplasto de tomateiro foi registrada a presença de variados aminoácidos, entre eles, glutamina, glutamato, alanina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) em concentrações suficientes para suportar o desenvolvimento nas fases iniciais da infecção por *Cladosporium fulvum* (SOLOMON; OLIVER, 2001). Os mesmos autores observaram que *C. fulvum* utiliza GABA como fonte de nitrogênio, desenvolvendo-se de forma similar a observada em aspartato ou glutamato evidenciando o seu potencial e eficiência como fonte de nitrogênio para o patógeno.

Em *S. cerevisiae* a falta de um único aminoácido ativa a expressão de genes para a biossíntese deles em um mecanismo chamado de controle geral de aminoácidos (resposta GCN) (HINNEBUSCH, 1988). Esse é regulado pelo fator de transcrição ScGcn4p (ARNDT; FINK, 1986) que possui um homólogo funcional CaGcn4p em *Candida albicans* (TRIPATHI et al., 2002).

Yin et al. (2004) analisaram o grau de conservação da resposta GCN entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*, para tanto compararam, sob restrição de aminoácidos, o proteoma de linhagens selvagens e homozigotas para deleção de Gcn4p. Concluíram que há similaridade da resposta GCN entre *S. cerevisiae* e *C. albicans*, além do incremento de proteínas relacionadas a biossíntese de aminoácidos foram induzidas a resposta geral a estresse e o metabolismo de carboidratos. Essa observação aponta, além da conservação da resposta GCN entre esses organismos, para a forte relação entre carbono e nitrogênio no metabolismo de fungos. Outros estudos que corroboram essa relação foram os de Kamthan et al. (2012) e Tripathi et al. (2002) que estudando os efeitos da fonte de carbono N-acetilglicosamina (GlcNAc) na morfogênese relataram atividade da resposta GCN e mudanças morfogênicas para pseudohifas de *C. albicans*.

O metabolismo de nitrogênio em fungos filamentosos é regulado por uma série de proteínas que garantem a assimilação de compostos nitrogenados na ausência de amônio e glutamina, as fontes preferenciais de nitrogênio (CADDICK et al., 1994; MARZLUF, 1997; PEREIRA et al., 2003). O nitrato é um desses composto nitrogenados não-preferenciais, após ser transportado para o meio intracelular por uma permease, o nitrato é reduzido sequencialmente a nitrito e depois amônio respectivamente pelas enzimas nitrato e nitrito redutase (PEREIRA et al., 2003).

A utilização de diferentes fontes de nitrogênio por fungos é regulada por um sistema de controle global e um específico. O sistema de controle global positivo *areA* de *Aspergillus nidulans* e seu correspondente *nit-2* em *Neurospora crassa*, e outros sistemas específicos realizam a desrepressão de mais de 100 genes estruturais, incluindo, por exemplo, genes que codificam transportadores de aminoácidos e de purinas, proteases extracelulares e enzimas catabólicas. Essa desrepressão é dependente da presença do indutor e da ausência de fontes preferências de nitrogênio (FU; MARZLUF, 1990). O desligamento de *Clnr1* ortólogo de *areA/nit2* em *C. lindemuthianum* tem efeito severo sobre a patogenicidade comprometendo o estágio de formação das hifas secundárias e com isso eliminando os sintomas de antracnose em *Phaseolus vulgaris* (PELLIER et al., 2003).

No patossistema *Magnaporthe grisea* e arroz os genes expressos durante a fase de penetração foram induzidos pela limitação de nitrogênio (TALBOT et al., 1997). A importância dos reguladores globais de nitrogênio na patogênese também já foi demonstrada para *M. grisea* e outros fungos fitopatogênicos, tais como *Fusarium oxysporum* e *C. acutatum* (DIVON et al., 2006; HOROWITZ et al., 2006) porém poucos estudos investigaram o impacto da restrição de nitrogênio sobre a expressão de proteínas.

Entre os poucos, destaca-se o trabalho de Desjardins et al. (1993) que investigou o fator de virulência dioxinivalenol (DON) produzido por *F. graminearum*. A restrição de nitrogênio ativa a via do tricoteceno e induz a biossíntese de DON. Os autores hipotetizaram que a restrição de nitrogênio promove fosforilações que ativam a biossíntese de DON, pois observou-se a elevação simultânea dos níveis de fosforilação, durante a restrição de nitrogênio, de metade das fosfoproteínas analisadas.

Wang et al. (2011) estudando o secretoma durante a restrição de nitrogênio em *Magnaporthe oryzae* identificaram 85 proteínas diferencialmente reguladas. As que cresceram em abundância estavam relacionadas com modificação de paredes celulares, por exemplo  $\beta$ -1-3-glicosidade e quitinases. Provavelmente os constituintes nitrogenados da parede celular vegetal foram usados como substrato nutrindo o fungo como também favorecendo sua penetração. Também foram verificados aumentos na abundância de enzimas detoxificantes de espécies reativas de oxigênio (ROS) como a catalase e a Cu/Zn superóxido desmutase as quais ajudam ao fungo suportar as ROS produzidas como defesa do hospedeiro. Por esse suporte as referidas enzimas são associadas à virulência segundo Skamnioti et al. (2007) e Tanabe et al. (2011).

Dados semelhantes foram registrados em *Colletotricum acutatum* patogênico ao morango, nesse fungo a proteção contra ROS é importante durante a fase de penetração via

apressório, pois a aplicação de antioxidantes exógenos extinguiu a produção de ROS e diminuiu a frequência de apressórios formados (BROWN et al., 2008).

#### **2.4. Considerações finais**

Para entender a complexa interação bioquímica entre fungo e hospedeiro, é fundamental conhecer as funções das moléculas sinalizadoras e seus receptores nas plantas e nos patógenos, como também o desencadeamento da defesa vegetal. As mais variadas abordagens são empregadas para esse fim, desde a identificação, detecção, translocação e cinética metabólica de biomoléculas secretadas nas interações fungo-planta. Contudo, frequentemente há a combinação de diversas abordagens e técnicas para fornecer resultados mais precisos, completos e inovadores nas pesquisas de interação bioquímica entre planta e patógeno.

O entendimento controverso do papel dessas proteínas na patogenicidade pode advir do fato que mecanismos pós-transcricionais e a degradação proteica podem resultar na falta de correspondência entre mRNA e a abundância proteica. Assim a abordagem exoproteômica emerge com uma ferramenta de grande valia nos estudos de interação entre fungo e hospedeiro, embora poucos estudos tenham sido feitos para caracterizar proteínas extracelulares fúngicas (PHALIP et al., 2005).

Proteínas pouco abundantes no secretoma são mal representadas em gel de eletroforese 2D. Essa técnica não consegue detectar todo o conjunto de proteínas que estão envolvidas em uma via metabólica ou de transdução de sinal. Avanços significantes foram feitos para superar essa limitação, principalmente com o emprego de instrumentos de espectrometria de massa. No entanto essas técnicas sozinhas não fornecem um quadro completo sobre a resposta de fungos a estresse (KROLL et al., 2014).

As concentrações e fontes de carbono e nitrogênio tem efeitos sobre o metabolismo dos fungos e em seu desenvolvimento pré-infectivo, vegetativo e reprodutivo. Assim relatar como fontes simples e complexas de carbono e orgânicas e inorgânicas de nitrogênio modificam o secretoma pode contribuir para entender mais sobre a interação bioquímica do fitopatógeno com o hospedeiro.

## REFERÊNCIAS

- ALKAN, N.; FLUHR, R.; PRUSKY, D. Role of ammonia secretion and pH modulation of pathogenicity of *Colletotrichum coccodes* on tomato fruit. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.21, n.8, p.1058-1066, 2008.
- AMARAL, A.M. et al. Defining the predicted protein secretome of the fungal wheat leaf pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Plos One**. v.12, n.7, 2012.
- ARNDT, K., FINK, G.R. GCN4 protein, a positive transcription factor in yeast, binds general control promoters at all 5' TGACTC 3' sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**. v.83, p.8516–8520, 1986.
- BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, effectors and R genes. **Annual Review of Phytopathology**. v.45, p.399-436, 2007.
- BERGER, S. et al. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. **Physiologia Plantarum**. v.122, p.419–428, 2004.
- BERGER, S.; SINHA, A.K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**. v.58, p.4019–4026, 2007.
- BHADAURIA, V. et al. EST mining identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **BMC Genomics**. v.12, p.327-343, 2011.
- BOER, V.M. et al. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, p.3265–3274, 2003.
- BROWN, S.H. et al. Differential protein expression in *Colletotrichum acutatum*: changes associated with reactive oxygen species and nitrogen starvation implicated in pathogenicity on strawberry. **Molecular Plant Pathology**. v.9, p.171–190, 2008.
- BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews**. v.79, p.473–495, 2004.
- BUSCOT, F. et al. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. **New Phytologist**. v.24, p.601–614, 2000.
- CADDICK, M.X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.64, p.169-177, 1994.
- CANNON, P.F.; SIMMONS, C.M. Diversity and host preference of leaf endophytic fungi in the Iwokrama Forest Reserve, Guyana. **Mycology**. v. 94, n. 2, p. 210–220, 2002.
- CHU, J. et al. Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* in response to nitrogen starvation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1854, n.5, p.437-448, 2015.

- CORRADI, N.; BONFANTE, P. The Arbuscular mycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. **PLoS Pathogens**. v.8, p.8–10, 2012.
- DARAN-LAPUJADE, P. et al. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. **Journal of Biological Chemistry**. v.279, p.9125–9138, 2004.
- DELAYE, L.; GARCÍA-GUZMÁN, G.; HEIL, M. Endophytes versus biotrophic and necrotrophic pathogens - are fungal lifestyles evolutionarily stable traits? **Fungal Diversity**. v. 60, p. 125–135, 2013.
- DESJARDINS, A.E.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological Reviews**. v.57, p.595–604, 1993.
- DIVON, H.H. et al. The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.485–497, 2006.
- DRORI, N. et al. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.6, p.3258–326, 2003.
- FELENBOK, B. The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA–alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. **Journal Biotechnology**. v.17, p.11–17, 1991.
- FERNÁNDEZ-ACERO, F.J. et al. 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. **Proteomics**. v.10, p.2270–2280, 2010.
- FIELD, K.J. et al. Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO<sub>2</sub> decline. **Nature Communications**. v.3, p.835, 2012.
- FLIPPY, M.; KOCIALKOWSKA, J.; FELENBOK, B. Relationships between the ethanol utilization (alc) pathway and unrelated catabolic pathways in *Aspergillus nidulans*. **European Journal Biochemistry**. v.270, p.3555–3564, 2003.
- FOSTER, A.J.; JENKINSON, J.M.; TALBOT, N.J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. **Embo Journal**. v.22, p.225–235, 2003.
- FU, Y.H.; MARZLUF, G.A. nit-2, the major nitrogen regulatory gene of *Neurospora crassa*, encodes a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. **Molecular and Cellular Biology**. v.10, p.1056–1065, 1990.
- GAN, P. et al. Comparative genomic end transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytologist**. v.197, p.1236–1249, 2013
- GARDINER, D.M.; KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Cross-kingdom gene transfer facilitates the evolution of virulence in fungal pathogens. **Plant Science**. v.210, p.151–158, 2013.

- GIRALDO, M.C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Reviews Microbiology**. v.11, p.800–814, 2013.
- GUIDI, F. et al. Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta** v.1804, p.1516–1525, 2010.
- GURVITZ, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Adr1p governs fatty acid beta-oxidation and peroxisome proliferation by regulating POX1 and PEX11. **Journal Biological Chemistry**. v.276, p.31825–31830, 2001.
- HAYWARD, R.D.; GOGUEN, J.D.; LEONG, J.M. No better time to FRET: shedding light on host pathogen interactions. **Journal of Biology**. v.9, p.12–16, 2010.
- HINNEBUSCH, A.G. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**. v.52, p.248–273, 1988.
- HOFF, B.; KÜCK, U. Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. **Current Genetics**. v.47, p.132–138, 2005.
- HORBACH, R. et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**. v.168, p.51–62, 2011.
- HOROWITZ, S. et al. A defect in *nir1*, a *nirA*-like transcription factor, confers morphological abnormalities and loss of pathogenicity in *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.341–354, 2006.
- HOWARD, R.J. Cytology of fungal pathogens and plant–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v.4, p.365–373, 2001.
- HUMPHREYS, C.P. et al. Mutualistic mycorrhiza like symbiosis in the most ancient group of land plants. **Nature Communications**. v.1, p.103, 2010.
- HYDE, K. et al. *Colletotrichum*: names in current use. **Fungal Diversity**. v. 39, p. 147–182, 2009.
- ISHIKAWA-ANKERHOLD, H.C.; ANKERHOLD, R.; DRUMMEN, G.P.C. Advanced fluorescence microscopy techniques: FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. **Molecules** v.17, p.4047–4132, 2012.
- JACKSON, M.A.; BOTHAST, R.J. Carbon concentration and carbo-to-nitrogen ratio influence submerged culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL13737. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, n.11, p.3435–3438, 1990.
- 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, n.3, 2013.
- JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**. v.444, p.323–329, 2006.

- JUHASZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. v.40, p.3519–3525, 2005.
- JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**. v.89, p.191-201, 2013.
- KABBAGE, M.; YARDEN, O.; DICKMAN, M.B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**. v.233, p.53–60, 2015.
- KAMTHAN, M. et al. Quantitative proteomics and metabolomics approaches to demonstrate N-acetyl-D-glucosamine inducible amino acid deprivation response as morphological switch in *Candida albicans*. **Fungal Genetics Biology**. v.49, p.369–378, 2012.
- KEMEN, E.; JONES, J.D. Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? **Trends in Plant Science**. v.17, p.448–457, 2012.
- KIM, Y. et al. Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**. v.108, p.2705–2715, 2011.
- KLEEMANN, J. et al. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. **Microbiology**. v.154, p.1204-1217, 2008.
- KLIONSKY, D.J.; CUERVO, A.M.; SEGLÉN, P.O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. **Autophagy**. v.3, p.181–206, 2007.
- KOLKMAN, A. et al. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. **Molecular Systems Biology**. v.2, 2006.
- KRAMER-HAIMOVICH, H. et al. Effect of ammonia production by *Colletotrichum gloeosporioides* on *pelB* activation, pectate lyase secretion, and fruit pathogenicity. **Applied and Environmental Microbiology**. v.72, p.1034-1039, 2006.
- KROLL, K.; PÄHTZ, V.; KNIEMEYER, O. Elucidating the fungal stress response by proteomics. **Journal of Proteomics**. v. 97, p. 151-163, 2014.
- KUMAR, D.S.S.; HYDE, K.D. Biodiversity and tissue-recurrence of endophytic fungi from *Tripterygium wilfordii*. **Fungal Diversity**. v. 17, p. 69- 90, 2004.
- LIMA FILHO, R.M.; OLIVEIRA, S.M.A.; MENEZES, M. Caracterização enzimática e patogenicidade cruzada de *Colletotrichum* spp. associados a doenças de pós-colheita. **Fitopatologia brasileira**. v. 28, n. 6, p. 620-625, 2003.
- LIU, X.Y.; DUAN, J.X.; XIE, X.M. *Colletotrichum yunnanense* sp. nov., a new endophytic species from *Buxus* sp. **Mycotaxon**. v. 100, p. 137-144, 2007.
- LÓPEZ-BERGES, M.S. et al. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. **The Plant Cell**. v. 22, p. 2459–2475, 2010.

- LU, Z. et al. *In vivo* study of *Trichoderma* pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, p. 3073–3081, 2004.
- MAJEAU, J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**. v. 101, p. 2331–2350, 2010.
- MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.17-32, 1997.
- MEDINA, M.L. et al. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics**. v. 5, p. 3153–3161, 2005.
- MIYARA, I. et al. Multi-factor regulation of pectate lyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits. **Molecular Plant Pathology**. v. 9, n. 3, p. 281–291, 2008.
- MONTANINI, B. et al. Gene expression profiling of the nitrogen starvation stress response in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 43, p. 630–641, 2006.
- MÜCH, S. et al. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**. v. 165, p. 41-51, 2008.
- MUELLER, O. et al. The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**. v. 45, 2008.
- MUR, L.A.J. et al. Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. **Annals of Botany**. v. 119, P. 703-709, 2016.
- O'CONNELL, R.J.; THON, M.R.; HACQUARD, S. et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**. v. 44, p. 1060–1065, 2012.
- PAGEAU, K. et al. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotiana tabacum* L. leaves. **Journal of Experimental Botany**. v. 57, p. 547–557, 2006.
- PATEL, H.; GUPTE, A. Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum* AGHP. **Bioresources and Bioprocessing**. v. 3, p. 11, 2016.
- PELLIER, A.L.; et al. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. **Molecular Microbiology**. v. 48, p. 639-655, 2003.
- PEREIRA, J.F. et al. Nitrato redutase em fungos filamentosos. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**. v. 31, p. 74-85, 2003.

- PERFECT, S.E.; GREEN, J.R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**. v. 2, p. 101–108, 2001.
- PETRINI, O.; Andrews, J.W. (Ed.); Hirano, S.S. (Ed.) Fungal endophytes in tree leaves. In: **Microbial ecology of leaves**. New York: Springer Verlag, p. 179–197, 1991.
- PHALIP, V. et al. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. **Current Genetics**. v. 48, p. 366–379, 2005.
- PIETERSE, C.M.J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**. v. 5, p. 308–316, 2009.
- PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in Chiang Mai, Thailand. **Fungal Diversity**. v. 39, p. 89–109, 2009.
- PROCTOR, R.H.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 8, p. 593–601, 1995.
- RAMPITSCH, C. et al. The phosphoproteome of *Fusarium graminearum* at the onset of nitrogen starvation. **Proteomics**. v. 10, p. 124–140, 2010.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**. v. 289, p. 1920–1921, 2000.
- REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. **Mycological Research**. v. 106, n. 12, p. 1427–1434, 2002.
- SALOHEIMO, M. et al. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal of Biochemistry**. v. 249, p. 584–595, 1997.
- SHARMA, K. Bionatural management of pests in organic farming. **Agrobios Newsletter**. v. 2, p. 296–325, 2004.
- SKAMNIOTI, P. et al. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 20, p. 568–580, 2007.
- SNOEIJERS, S. et al. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**. v. 106, p. 493–506, 2000.
- SOANES, D.M. et al. Regulation of the MPG1 hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 15, p. 1253–1267, 2002.
- SOLOMON, P.S.; OLIVER, R.P. The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. **Planta**. v. 213, p. 241–249, 2001.
- SOLOMON, P.S.; TAN, K.C.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**. v. 4, p. 203–210, 2003.

- STASKAWICZ, B.J. Genetics of plant–pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**. v. 125, p. 73–76, 2001.
- STEPHAN, J.S. et al. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v. 106, p. 17049–17054, 2009.
- STEPHENSON, S.A. et al. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 13, p. 929–941, 2000.
- STRICKER, A.R.; MACH, R.L.; de GRAAFF, L.H. Regulation of transcription of cellulase- and hemicellulase-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 78, p. 211–220, 2008.
- STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 67, p. 491–502, 2003.
- SURYANARAYANAN, T.S.; MURALI, T.S.; VENKATESAN, G. Occurrence and distribution of fungal endophytes in tropical forests across a rainfall gradient. **Canadian Journal of Botany**. v. 80, p. 818–826, 2002.
- TALBOT, N.J. et al. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 50, p. 179–195, 1997.
- TANABE, S. et al. The role of catalase–peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v. 24, p. 163–171, 2011.
- TAVERNIER, V. et al. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. **Journal of Experimental Botany**. v. 58, p. 3351–3360, 2007.
- THINES, E.; WEBER, R.W.; TALBOT, N.J. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**. v. 12, p. 1703–1718, 2000.
- THOMMA, B.P. et al. Nitrogen controls in planta expression of *Cladosporium fulvum* Avr9 but no other effector genes. **Molecular Plant Pathology**. v. 7, p. 125–130, 2006.
- TRIPATHI, G. et al. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. **EMBO Journal**. v. 21, p. 5448–5456, 2002.
- TYLER, B.M. et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. **Science**. v. 313, p. 1261–1266, 2006.
- WALTERS, D.R.; BINGHAM, I.J. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. **Annals of Applied Biology**. v. 151, p. 307–324, 2007.
- WANG, X. et al. The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions. **Virulence**. v. 5, p. 722–32, 2014.

WANG, Y. et al. Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation. **Journal of Proteome Research**. v. 10, p. 3136–3148, 2011.

WU, J. et al. Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v. 101, p. 3148–3153, 2004

YI, M.; VALENT, B. Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. **Annual Review of Phytopathology**. v. 51, p. 567–611, 2013.

YIN, Z. et al. Proteomic response to amino acid starvation in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Proteomics**. v. 4, p. 2425–2436, 2004.

ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C.M. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. v. 25, p. 139–150, 2012.

ZEILINGER, S.; et al. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 40, n. 2, p. 182-207, 2015.

### **3. Reação dos tecidos foliares de *Solanum lycopersicum* e *Phaseolus lunatus* ao secretoma de *Colletotrichum* spp. produzidos em diferentes condições nutricionais.**

#### **RESUMO**

As proteínas extracelulares são fatores significantes de patogênese e virulência de *Colletotrichum*. O estresse nutricional enfrentado pelos fungos nas primeiras fases da infecção constitui um estímulo à produção de fatores de patogenicidade necessários ao sucesso da colonização. Portanto, estudar esses fatores sob estresse nutricional contribui para o melhor entendimento da interação planta-patógeno. O presente estudo objetivou registrar o efeito do estresse nutricional de carbono e nitrogênio sobre as lesões teciduais causadas por *Colletotrichum* spp. em *Solanum lycopersicum* (*Sl*) e *Phaseolus lunatus* (*Pl*). Três espécies de *Colletotrichum* foram cultivadas sob estresse nutricional de fontes de carbono 10g/L (dextrose, sacarose, amido e sorbitol) e fontes de nitrogênio 1g/L (molibdato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de potássio, L-asparagina e extrato de levedura). Foram avaliados o diâmetro das colônias, produção de esporos, massa fresca, seca, variação de massa, variação de pH e a produção de proteínas, e lesões teciduais. De modo geral sacarose e as fontes inorgânicas de nitrogênio causaram estresse nutricional nos fungos. As combinações sacarose com nitrato de potássio e sorbitol com asparagina registraram alcalinização e sorbitol com cloreto de amônio registrou acidificação. O tratamento sorbitol com extrato de levedura sustentou a maior produção de proteínas e sorbitol com cloreto de amônio a menor. No entanto a associação sorbitol com nitrato de potássio proporcionou lesões teciduais compatíveis com o teste de patogenicidade e *Sl* exibiu maior diversidade de lesões foliares. Assim, sorbitol combinado com nitrato de potássio simula melhor o estresse nutricional enfrentado nas fases iniciais de infecção, mantendo as relações de especificidade entre patógeno e hospedeiro.

**Palavras-chave:** Carbono, nitrogênio, relação C:N, especificidade.

### ABSTRACT

The extracellular proteins are significant factors of pathogenesis and virulence of *Colletotrichum*. The nutritional stress faced by fungi in the early stages of infection is a stimulus to the production of pathogenicity factors necessary for successful colonization. Therefore, studying these factors under nutritional stress contributes to a better understanding of the plant-pathogen interaction. The present study aimed to record the effect of nutritional stress of carbon and nitrogen on the tissue lesions caused by *Colletotrichum* spp. in *Solanum lycopersicum* (Sl) and *Phaseolus lunatus* (Pl). Three species of *Colletotrichum* were cultivated under nutritional stress from 10g / L carbon sources (dextrose, sucrose, starch and sorbitol) and nitrogen sources 1g / L (ammonium molybdate, ammonium chloride, potassium nitrate, L-asparagine and extract of yeast). The diameter of the colonies, spore production, fresh mass, dry matter, mass variation, pH variation and protein production, and tissue lesions were evaluated. In general sucrose and inorganic sources of nitrogen caused nutritional stress in fungi. The sucrose combinations with potassium nitrate and sorbitol with asparagine registered alkalization and sorbitol with ammonium chloride registered acidification. The sorbitol treatment with yeast extract sustained the highest production of proteins and sorbitol with the lowest ammonium chloride. However, the association of sorbitol with potassium nitrate provided tissue lesions compatible with the pathogenicity test and Sl showed greater diversity of leaf lesions. Thus, sorbitol combined with potassium nitrate better simulates the nutritional stress faced in the initial stages of infection, maintaining the specificity relations between pathogen and host.

**Keywords:** Carbon, nitrogen, C: N ratio, specificity.

### 3.1. Introdução

Diferente das condições de laboratório, a disponibilidade de carbono sob a forma de glicose é limitada durante a fase inicial da infecção. Tanto a limitação de carbono quanto a de nitrogênio são impactantes sobre a fisiologia dos fungo. Os dados sobre mudanças na expressão genética durante o déficit nutricional de glicose são numerosos, especialmente em *Saccharomyces cerevisiae* (BOER et al., 2003; DARAN-LAPUJADE et al., 2004; WU et al., 2004), porém pouco é conhecido sobre mudanças no proteoma durante esse estresse (KROLL et al., 2014).

As fontes de nitrogênio na planta são limitadas, e o déficit de nitrogênio pode ser o gatilho para o desenvolvimento da doença regulando a expressão de genes de patogenicidade (LÓPEZ-BERGES et al., 2010; THOMMA et al., 2006). Contudo, estudos mostram que há um suprimento de nitrogênio nos tecidos vegetais, suficiente para o pleno desenvolvimento do patógeno (PAGEAU et al., 2006; SOLOMON et al., 2003; TAVERNIER et al., 2007; WALTERS; BINGHAM, 2007).

A presença de uma fonte de nitrogênio parece ser um importante regulador da expressão de fatores de virulência para *Colletotrichum gloeosporioides* (MIYARA et al. 2008), já o déficit desse nutriente estimula a sincronia no desenvolvimento pré-infectivo em espécies de *Colletotrichum* (HOROWITZ et al., 2006), ratificando o papel do estresse nutricional nos primeiros momentos da infecção como estímulo à produção dos fatores de virulência (SOANES et al., 2002).

No patossistema *Magnaporthe grisea* e arroz a expressão de genes ativos durante a fase de penetração foi induzida pela limitação de nitrogênio (TALBOT et al., 1997). Os reguladores globais de nitrogênio também contribuem para a patogênese de *M. grisea*, *Fusarium oxysporum*, *C. lindemuthianum* e *C. acutatum* (DIVON et al., 2006; HOROWITZ et al., 2006; PELLIER et al., 2003) porém poucos estudos investigam o impacto da restrição de nitrogênio sobre a expressão de proteínas.

Estudos (JACKSON; BOTHAST,1990; PATEL; GUPTE, 2016) dedicaram-se a estabelecer condições ótimas para o crescimento e esporulação de espécies de *Colletotrichum* e outros fungos em meio de cultivo líquidos e sólidos, ou seja, nutrir o fungo de forma que o mesmo expresse todo seu potencial fisiológico estando ai incluso o proteoma.

Simular *in vitro* as condições de estresse nutricional enfrentadas pelos fitopatógenos nas fases iniciais da infecção é uma estratégia válida para investigar os efeitos do estresse nutricional sobre proteínas e outras compostos extracelulares.

Os fungos do gênero *Colletotrichum* usam diferentes estratégias nutricionais e são patogênicos a vários órgãos vegetais em diferentes fases fenológicas, por isso são patógenos de interesse econômico. A cultivar MicroTom de *Solanum lycopersicum* enquadra-se como planta de interesse comercial, apresenta protocolos adaptados para estudo da genética reversa e possui uma gama de mutantes correlatos com os da planta modelo *Arabidopsis thaliana*. MicroTom e *Colletotrichum* spp são dois organismos modelo, o que facilita o uso em estudos 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. Mesmo com o desenvolvimento de fungicidas efetivos contra doenças do tomateiro a ocorrência de linhagens resistentes acaba por anulá-la. Isso sugere que as interações tomate-patógeno ainda necessitam de investigação detalhada dos mecanismos que conferem uma resistência ampla e duradoura. (ARIE et al., 2007).

Estudar a produção de fatores de patogenicidade sob estresse nutricional contribui para o melhor entendimento da interação planta-patógeno, os resultados podem ter relevância genérica para as interações planta-patógeno. Este trabalho objetivou estabelecer condições de cultivo, em déficit nutricional baseado em carbono e nitrogênio, que permitam avaliar o efeito de substâncias extracelulares de *Colletotrichum* spp. ativas contra tecidos foliares de *S. lycopersicum* e *Phaseolus lunatus*.

### **3.2. Material e métodos**

Os três isolados de *Colletotrichum* spp. foram selecionados dentre os que integram as coleções de laboratórios situados no Centro de Ciências Agrárias (CECA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL). Os isolados foram selecionados conforme informações e identificações morfológicas e moleculares das referidas coleções.

Os isolados foram caracterizados molecularmente pelo sequenciamento parcial do gene que codifica a Glicerol-3-fostato-dehidrogenase (GAPDH) amplificados por reação enzimática da DNA polimerase e iniciadores alvo para o gene (GLASS; DONALDSON, 1995; NOIREUNG *et al.*, 2012). As sequências de nucleotídeos identificadas foram comparadas com sequências depositadas no banco de dados NCBI utilizando a ferramenta *Blast n*. A

identificação foi baseada no valor de máxima similaridade determinado pela comparação com as sequências do banco de dados.

Os isolados fúngicos foram crescidos em meio BDA, fotoperíodo de 12h a 25°C durante cinco dias para produção e crescimento de micélio que foi utilizado como inóculo no teste de patogenicidade e nos ensaios de estresse nutricional *in vitro*.

O teste de patogenicidade foi realizando mediante deposição de discos de meio de cultivo contendo micélio sobre folhas de *S. lycopersicum* e *P. lunatus*. Cada isolado foi inoculado em três plantas distintas, de cada planta foram inoculados nove folíolos. A testemunha foi constituída por disco de meio de cultivo sem micélio. Após inoculação as plantas foram mantidas em BOD no escuro, sob câmara úmida por 48h. Após esse período foram mantidas em BOD sob fotoperíodo de 12h de luz,  $\pm 25^\circ$  até o momento da avaliação. As plantas foram examinadas aos sete dias após inoculação e avaliadas considerando a presença das lesões características da antracnose. Dessas lesões foram reisolados os fungos inoculados.

Foram realizados experimentos de estresse nutricional com objetivo quantificar as taxas de crescimento e esporulação, além de registrar e comparar coloração e textura micelial de três espécies de *Colletotrichum*. Inferindo assim sobre os impactos dessas fontes na fisiologia desses fungos.

Nos ensaio de estresse nutricional foi utilizado um meio base de minerais no qual foram adicionados fontes de carbono e nitrogênio. O meio base foi constituído de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g);  $\text{ZnSO}_4$  ( $4,4 \cdot 10^{-4}$  g);  $\text{FeCl}_3$  ( $4,8 \cdot 10^{-4}$ g);  $\text{MnCl}_2$  ( $3,6 \cdot 10^{-4}$ g);  $\text{MgSO}_4$  (0,1g) e de solução traço (0,01mL) em 1L de água destilada. A solução traço continha ácido cítrico (50g);  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  (10g);  $\text{CuSO}_4$  (2,5g);  $\text{MnSO}_4$  (5g);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,5g);  $\text{NaMoO}_4$  (0,5g) em 1L de água destilada.

No primeiro experimento foram utilizadas quatro fontes de carbono (dextrose, sacarose, amido e sorbitol) na concentração final de 10g/L. Baseado nos resultados desse experimento as fontes de nitrogênio foram associadas as fontes de carbono (sacarose e sorbitol). Essas duas fontes de carbono foram selecionadas considerando dano à fisiologia fúngica e secretoma com diversidade de sintomas no tecido vegetal. As duas fontes de carbono foram combinadas separadamente às fontes inorgânicas de nitrogênio (molibdato de amônio, cloreto de amônio, nitrato de potássio) e orgânicas simples (L-asparagina) e complexa (extrato de levedura) todas na concentração final de 1g/L. Os ensaios foram conduzidos em meio sólido (Agar a 18g/L) vertido em placas de Petri (80mm) e em meio líquido (50mL em Erlenmeyer de 250mL). Cada placa de Petri e cada Erlenmeyer constituiu uma unidade experimental.

O experimento em meio sólidos foi mantido em BOD a 25°C e fotoperíodo de 12h por dez dias. O diâmetro médio do crescimento micelial, número médio de esporos produzidos, textura e coloração das colônias de cada espécie fúngica foram avaliadas.

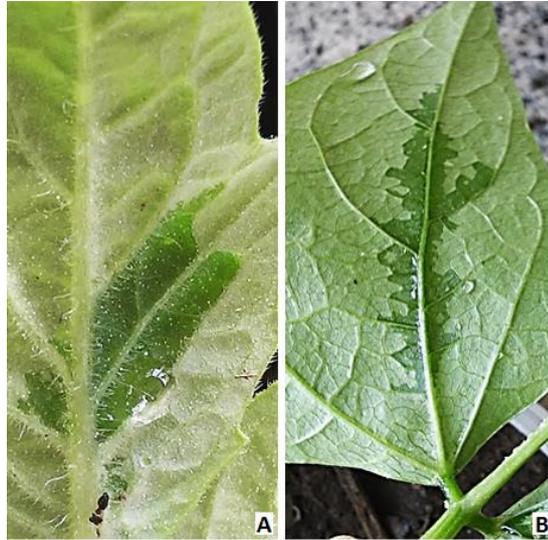
O experimento em meio líquido foram mantidos em condições ambientais idênticas durante 21 dias. Foram avaliadas a produção de massa fresca e seca, variação de massa, produção de esporos e variação de pH de cada espécie fúngica. A fase líquida (secretoma) foi separada do crescimento micelial mediante filtração em oito dobras de compressa cirúrgica estéril.

O crescimento micelial foi determinado pela massa fresca, massa seca (após 24h de secagem a 30°C) e variação de massa (dada pela diferença entre massa fresca e seca). O pH do secretoma foi medido com o auxílio do pHmetro (Quimis Q400AS), a variação de pH foi calculada pela diferença entre o pH das testemunhas não inoculadas e o pH dos respectivos tratamentos inoculados.

A produção de esporos foi quantificada pela média de três contagens ao hemacitômetro. Os esporos foram separados do secretoma por centrifugação de 1 minuto a 1000 rpm e aproximadamente 200µL do secretoma livre de esporos foi infiltrado na nervura central (figura 1) de folhas de *S. lycopersicum* e *P. lunatus*. Cada secretoma foi infiltrado em três plantas de cada espécie, em cada planta nove folíolos, os quais foram observados durante sete dias e o tipo de lesão foi registrado.

A classificação do estresse fisiológico foi feita conforme o desempenho dos isolados contra às diferentes fontes de carbono e nitrogênio. Foi considerado mais estressante a fonte que proporcionou o pior desempenho fúngico na maioria das variáveis analisadas.

Figura 1 - Face abaxial das folhas de *Solanum lycopersicum* (A) e *Phaseolus lunatus* (B) perfundida venalmente com agulha e seringa.



Para quantificar a fração proteica dos secretomas foram elaboradas duas diluições seriadas de albumina de soro bovino BSA (*bovine serum albumin*), uma de 1 a 0,1 mg/mL e outra de 0,1 a 0,01 mg/mL. Tais séries diluídas foram submetidas a espectrofotometria sob o comprimento de onda de 280nm. O conjunto das absorbâncias médias de cada diluição de BSA foi submetida a uma regressão linear obtendo-se assim uma equação de reta usada para inferir sobre as concentrações de proteínas nos secretomas. Água destilada estéril foi usada como branco nas leituras para a confecção das curvas-padrão e a testemunha de cada tratamento como branco nas leituras dos secretomas.

### 3.2.1. Delineamento experimental e análise estatística

O experimento em meio sólido de estresse em fontes de carbono contou com 16 tratamentos com quatro repetições perfazendo 64 parcelas. Os de fontes de nitrogênio em sacarose e em sorbitol contaram, cada um, com 20 tratamentos com quatro repetições perfazendo 80 parcelas. Já em meio líquido os experimentos contaram com 16 tratamentos com quatro repetições perfazendo 64 parcelas.

Foram quantificadas as concentrações estimadas de proteína em 48 tratamentos com quatro repetições perfazendo 192 parcelas.

Todos os experimentos foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade, cada experimento e variável foi analisado individualmente.

Para reduzir o coeficiente de variação e melhorar a resolução do teste de médias os dados, variação de pH e produção de proteínas foram transformados por SQDR (Y+1).

Dessa maneira também foram transformados os dados de massa seca dos experimentos que combinavam sacarose e sorbitol com fontes de nitrogênio. Ainda nesses experimentos a variação de pH foi transformada por SQDR (YGauss+1).

### 3.3. Resultados

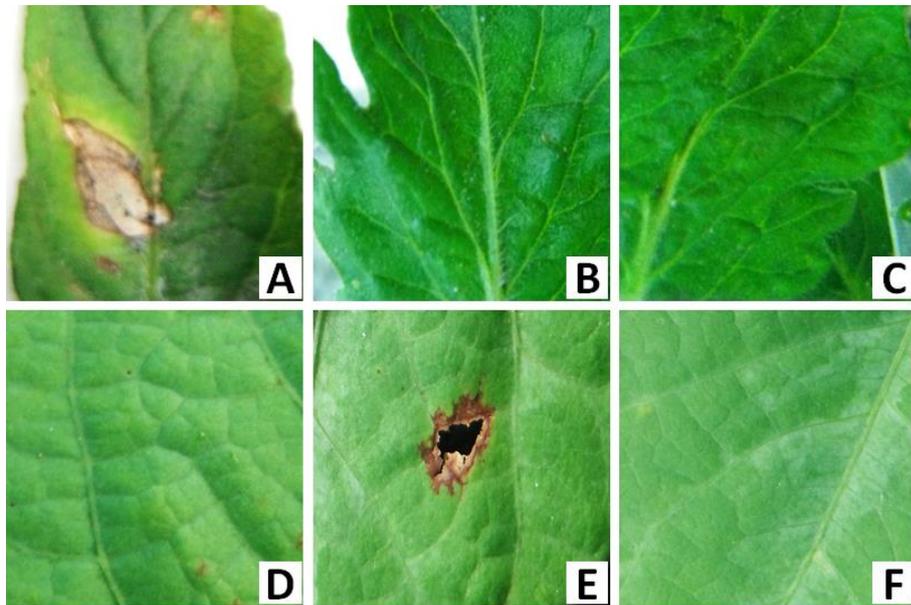
O fragmento de DNA amplificado referente ao gene do GAPDH apresentou um tamanho estimado de 300 pares de bases e o sequenciamento revelou fragmentos amplificados com aproximadamente 200 pares de bases. As sequências obtidas foram identificadas com auxílio da ferramenta *Blast n* disponível no endereço eletrônico do *National Center for Biotechnology Information* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Baseado principalmente na similaridade com sequências depositadas no GenBank. O isolado foram identificado como *Colletotrichum siamense*, *C. truncatum* e *C. musae* (Tabela 1).

Tabela 1 – Identificação molecular dos isolados de *Colletotrichum* empregados no estudo.

Identificação	Sequência no NCBI	Identificação cultural	Similaridade	Pontuação	Valor E
<i>C. siamense</i>	KP703271.1	CBS112985	99%	418	6e-113
	KJ769241.1	RR 12-4	98%	424	1e-114
<i>C. truncatum</i>	KC109590.1	CTM12	98%	448	8e-122
	KU743257.1	F21182A	98%	414	8e-112
<i>C. musae</i>	JX009929.1	CBS192.31	99%	438	4e-119
			99%	431	7e-117

O teste de patogenicidade confirmou que *C. siamense* (*Cs*) é patogênico ao hospedeiro *S. lycopersicum* var. MicroTom. O *C. truncatum* (*Ct*) é patogênico somente ao hospedeiro *P. lunatus*. O isolado de *C. musae* (*Cm*) não promoveu lesões em nenhum dos dois hospedeiros testados (Figura 2). As lesões observadas evoluíam desde pequenos pontos necróticos circundados por uma halo de clorose até grandes manchas de coloração amarronzadas e ligeiramente deprimidas.

Figura 2 - Teste de patogenicidade. Da esquerda para a direita Cs, Ct e Cm.  
Folhas de *Solanum lycopersicum* (A-C) e folhas de *Phaseolus lunatus* (D-F).



### 3.3.1. Estresse nutricional de fontes de carbono em meio sólido

No experimento de estresse nutricional em meio sólido o diâmetro médio das colônias sete dias após inoculação (7 dai) variou de 5,5 a 7,5 centímetros (Tabela 2). O meio com sorbitol promoveu o maior diâmetro médio e o meio com sacarose exibiu o menor diâmetro médio. Não houve diferença significativa entre os meios com amido e com dextrose. Comparando o crescimento dos isolados em cada fonte de carbono, para todas as fontes testadas, o *C. truncatum* produziu o menor e *C. musae* o maior diâmetro.

Diante dos resultados a sacarose e o sorbitol foram selecionadas como fonte de carbono para o experimento de estresse nutricional com fontes de nitrogênio por induzir o menor e maior diâmetro médio respectivamente.

Tabela 2 - Diâmetro médio (cm) das colônias de espécies de *Colletotrichum* sete dias após inoculação sob estresse nutricional de carbono.

Fontes de carbono	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Dextrose	6,5 ABb	5,6 Aa	7,5 Bc
Sacarose	6,3 Ab	5,5 Aa	7,0 Ac
Amido	6,8 Bb	6,0 Ba	7,5 Bc
Sorbitol	7,0 Cb	6,1 Ba	7,3 ABc
			C.V.%=3,82

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

A produção de esporos variou de 0 a  $2 \times 10^5$  esporos/mL, somente *C. musae* respondeu à fonte de carbono na indução da esporulação. Para essa espécie a fonte que determinou a menor produção de esporos foi a sacarose.

### 3.3.2. Estresse nutricional de fontes de carbono em meio líquido

No experimento em meio líquido, o acúmulo de massa fresca variou de 0,13 a 4,17 gramas (Tabela 3). O menor acúmulo de massa fresca ocorreu nos cultivos com dextrose (*Ct*) e sacarose (*Cs* e *Cm*) e diferiu significativamente dos meios com amido e sorbitol. Comparando isolados entre as diferentes fontes de carbono, o isolado *Cs* exibiu a maior capacidade de produção de massa fresca em todas as fontes e o isolados *Ct* o menor crescimento para a maioria das fontes, exceto para sorbitol.

Tabela 3 - Massa fresca (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.

Fontes de carbono	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Dextrose	3,00 Ab	0,13 Aa	0,59 Aa
Sacarose	3,18 Ab	0,35 Aa	0,39 Aa
Amido	3,79 ABb	1,78 Ba	2,14 Ba
Sorbitol	4,17 Bb	1,92 Ba	1,46 Ba
			C.V.%=16,4

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

Avaliando o acúmulo de massa seca, o menor acúmulo aconteceu no cultivo com dextrose para todos o isolados e o maior acúmulo de massa seca aconteceu para *Cs* com sorbitol e para *Ct* e *Cm* com amido (Tabela 4). Comparando os isolados entre as diferentes fontes de carbono, os isolados variaram no desempenho. O *Cs* teve o menor acúmulo para amido, o *Ct* teve menor acúmulo para sacarose e o *Cm* teve menor desempenho para dextrose, sacarose e amido. O melhor desempenho dos três isolados também variou entre as fontes. O *Cs* teve melhor desempenho no meio suplementado com dextrose, sacarose e sorbitol. Os isolados *Ct* e *Cm* apresentaram o maior acúmulo de matéria seca no meio com amido.

Tabela 4 - Massa seca (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.

Fontes de carbono	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Dextrose	0,05 Ab	0,01 Aab	0,02 Aab
Sacarose	0,08 ABb	0,03 Aa	0,03 Aa
Amido	0,09 BCa	0,13 Bab	0,14 Bb
Sorbitol	0,11 Cb	0,09 Bab	0,05 Aa
C.V.%=2,13			

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

Os valores de variação entre massa fresca e seca foi aplicada para balizar as diferenças de comportamento entre ambas. Uma maior massa fresca não representava uma maior massa seca devido a capacidade diferenciada de retenção de líquido. A variação de massa ficou entre 0,12 e 4,07 gramas (Tabela 5). As menores variações ocorreram nos cultivos com dextrose e as maiores com sorbitol. Não houve diferença significativa entre dextrose e sacarose e entre amido e sorbitol para os isolados *Ct* e *Cm*. O isolado *C. siamense* mostrou diferença significativa dos demais em todos os cultivos.

Tabela 5 – Variação de massa (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.

Fontes de carbono	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Dextrose	2,96 Ab	0,12 Aa	0,57 Aa
Sacarose	3,11 Ab	0,31 Aa	0,37 Aa
Amido	3,70 ABb	1,65 Ba	2,00 Ba
Sorbitol	4,07 Bb	1,84 Ba	1,38 Ba
C.V.%=25,92			

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

A suplementação de carbono influenciou a esporulação de *C. musae*, apenas o cultivo dessa espécie com a fonte de carbono dextrose não diferiu significativamente do controle. Nele o número de esporos por mL variou de 0,05 a  $0,1 \times 10^5$  esporos/mL.

Na variável pH, observou-se acidificação nos cultivos em diferente fontes de carbono (Tabela 6). Os maiores valores de acidificação foram registrados nos cultivos de *C. siamense* em sacarose e de *C. truncatum* em dextrose. No entanto para *C. musae* a maior acidificação foi observada no meio com sorbitol.

Tabela 6 – Variação de pH do secretoma de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.

Fontes de carbono	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Dextrose	-0,25 Ab	-0,47 Cc	-0,10 Aa
Sacarose	-0,59 Bc	-0,52 Cc	-0,17 ABb
Amido	-0,24 Ab	-0,23 Bb	-0,07 Aa
Sorbitol	-0,27 Ac	-0,16 Ab	-0,24 Bbc
			C.V.% = 3,64

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

A produção de proteína variou de 0 a  $5,4 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabela 7). Os meios suplementados com dextrose, sacarose e sorbitol não diferenciaram nos níveis de proteínas secretadas tendo uma variação de 0 a  $0,124 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . O meio suplementado com amido proporcionou maiores níveis de proteínas secretado com valores acima de  $0,824 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  para os três isolados. Ao comparar os níveis de proteínas secretado pelos isolados para cada fonte de carbono não houve diferença significativa.

Tabela 7 – Produção de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de carbono.

Fontes de carbono	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Dextrose	0,124 Aa	0,060 Aa	0,060 Aa
Sacarose	0,135 Aa	0,036 Aa	0 Aa
Amido	0,824 Ba	5,410 Bb	1,034 Ba
Sorbitol	0,100 Aa	0,095 Aa	0,316 ABa
			C.V.%=10,62

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

3.3.3. Lesão tecidual sob estresse de fontes de carbono A infiltração do meio de cultivo livre de esporos (secretoma) causou lesão nas folhas infiltradas (Figura 3). O efeito foi mais acentuado nas folhas de *S. lycopersicum*. O cultivo com dextrose para o isolado *Cs* revelou maior capacidade de induzir lesões. Observa-se também clorose por toda a folha. Os secretoma das espécies *Ct* e *Cm* causaram lesões menores e clorose contidas apenas na região infiltrada. As infiltrações no *P. lunatus* geraram lesões com clorose contidas nas regiões marginais próximas da lesão causada pela agulha utilizada para infiltrar o secretoma.

O cultivo dos fungos em sacarose alterou o padrão de lesão nas folhas infiltradas de *S. lycopersicum* (Figura 4) causando lesões menores. O isolado *Cs* produziu um secretoma que causou uma lesão contida a região infiltrada. A redução da lesão causada nas folhas pelo secretoma foi mais acentuado para os isolados *Ct* e *Cm*. No entanto, a clorose nas folhas foi intensa para os três secretomas infiltrados. As infiltração no *P. lunatus* não diferiram do padrão de lesão apresentado para o secretoma produzido no meio com dextrose. O fato novo foi que os secretomas produzidos em meio com sacarose não induziram clorose.

Figura 3 – Lesões em folhas de *S. lycopersicum* e de *P. lunatus* causadas pela infiltração com secretomas de *C. siamense*, *C. truncatum* e *C. musae* cultivados em meio contendo dextrose como fonte de carbono. *S. lycopersicum* (A-D); *P. lunatus* (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).

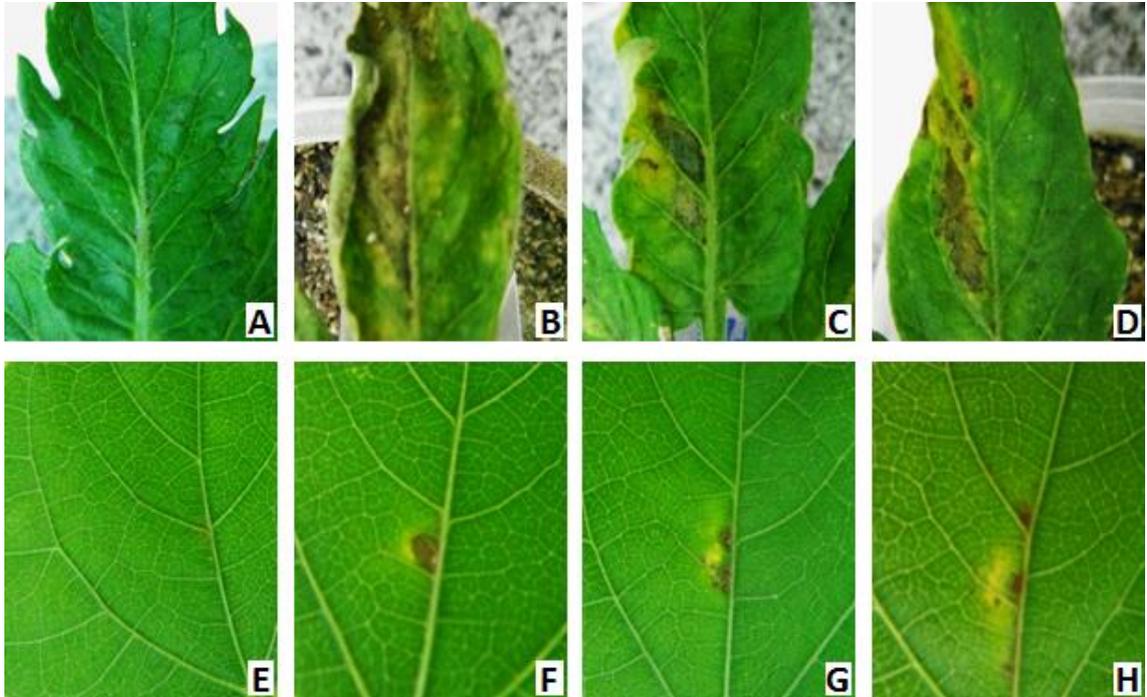
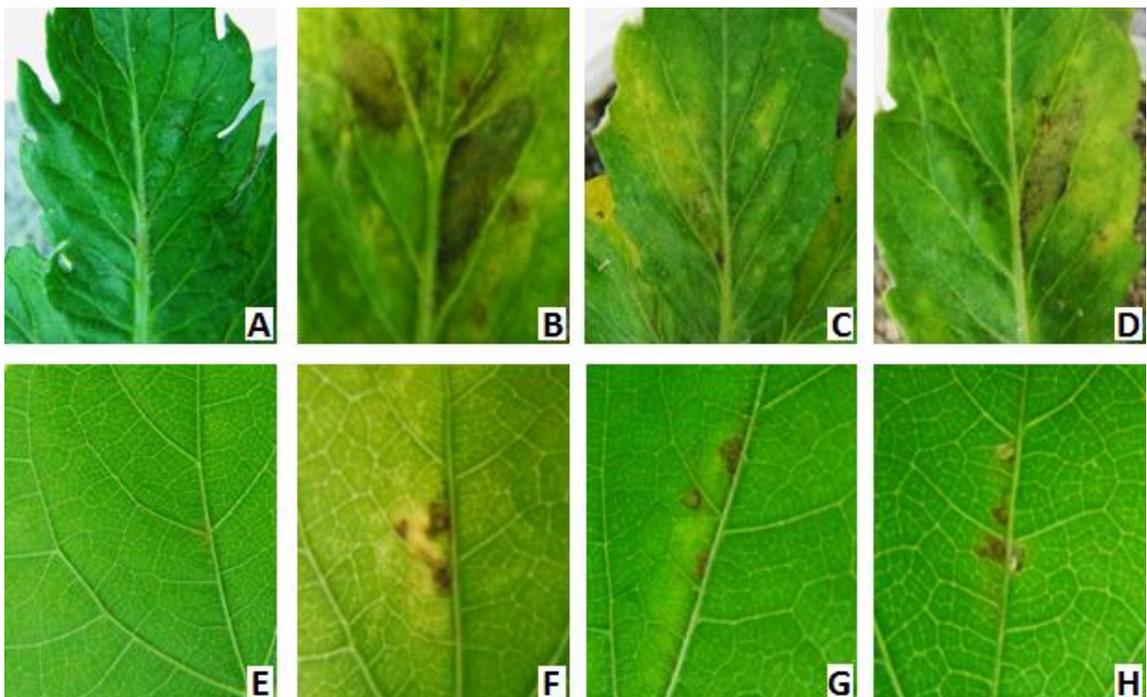


Figura 4 - Lesões em folhas de *S. lycopersicum* e de *P. lunatus* causadas pela infiltração com secretomas de *C. siamense*, *C. truncatum* e *C. musae* cultivados em meio contendo sacarose como fonte de carbono. *S. lycopersicum* (A-D); *P. lunatus* (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).



O cultivo dos fungos em amido alterou o padrão de lesão das folhas infiltradas de *S. lycopersicum* (Figura 5). O secretoma dos três isolados desenvolveram o mesmo tipo de lesão de coloração negra com depressão restrita a áreas da infiltração. Nota-se a redução da clorose relatada anteriormente. As infiltrações em *P. lunatus* também causaram lesões menores. As lesões que eram reduzidas para as outras infiltrações quase desapareceram sendo o efeito mais evidente na infiltração com o secretoma do *Ct*.

O cultivo dos fungos em sorbitol alterou o padrão de resposta nas folhas infiltradas de *S. lycopersicum* (Figura 6), neste caso houve redução das lesões. O secretoma do cultivo com *Cs* apresentou lesões restritas e menores que a área infiltrada, porém com clorose acentuada. Os secretomas das espécies *Ct* e *Cm* não causaram reação nas folhas. A redução dos danos causados pelo secretoma produzido, tendo amido como fonte de carbono, também foi observada nas infiltrações em *P. lunatus*; as lesões desapareceram nos três isolados.

Figura 5 - Lesões em folhas de *S. lycopersicum* e de *P. lunatus* causadas pela infiltração com secretomas de *C. siamense*, *C. truncatum* e *C. musae* cultivados em meio contendo amido como fonte de carbono. *S. lycopersicum* (A-D); *P. lunatus* (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).

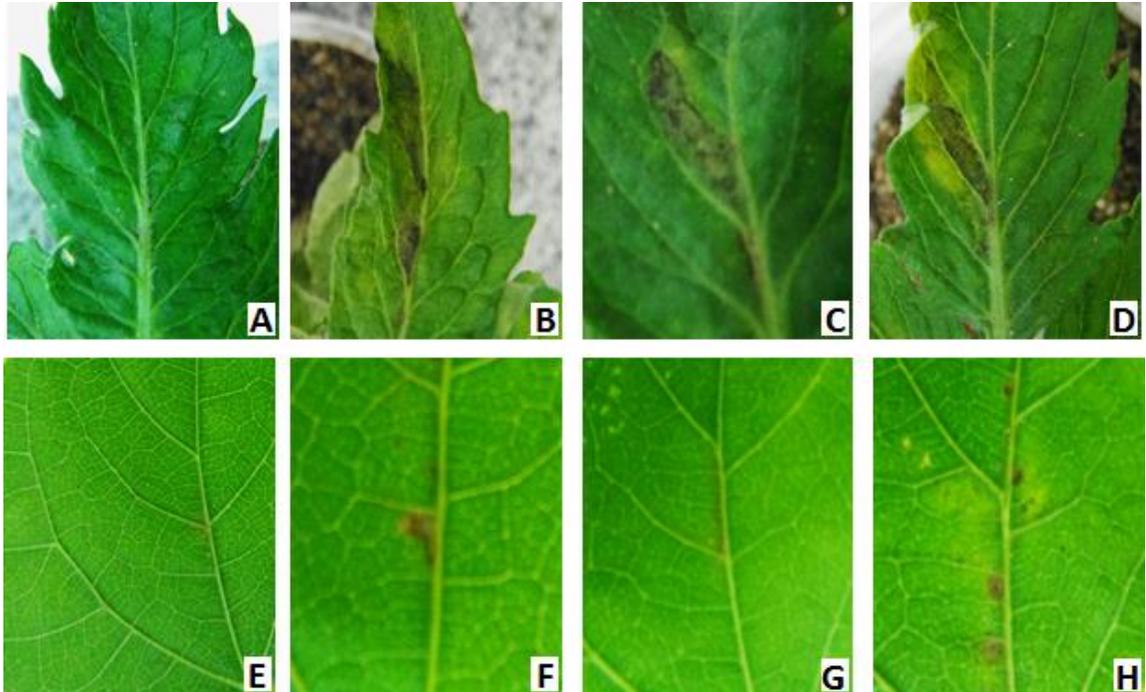
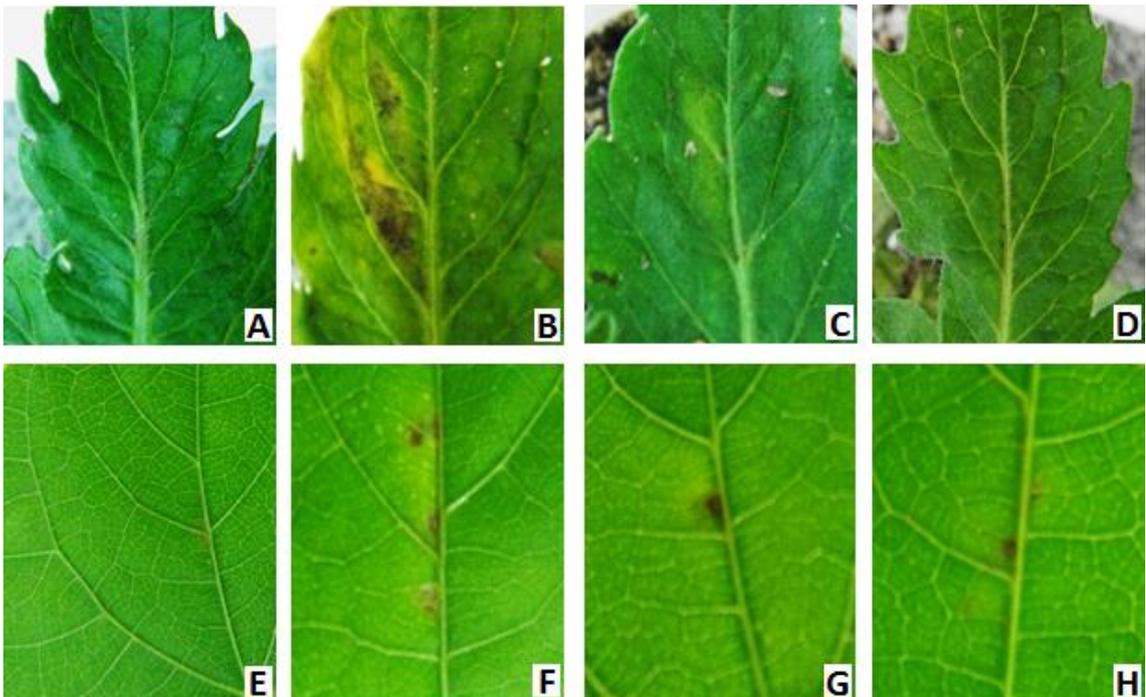


Figura 6 - Lesões em folhas de *S. lycopersicum* e de *P. lunatus* causadas pela infiltração com secretomas de *C. siamense*, *C. truncatum* e *C. musae* cultivados em meio contendo sorbitol como fonte de carbono. *S. lycopersicum* (A-D); *P. lunatus* (E-H); Controles (A e E), Cs (B e F), Ct (C e G), Cm (D e H).



### 3.3.4. Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose no meio sólido

A fonte de nitrogênio influenciou o crescimento da colônia em meio sólido. O diâmetro médio variou de 0 a 7,95 centímetros (Tabela 8). O meio com nitrato de potássio promoveu o maior diâmetro no quinto dia após inoculação (5 dai). O meio com cloreto de amônio exibiu o menor diâmetro médio aos cinco dai. O meio com molibdato de amônio inibiu totalmente o crescimento das colônias.

Os isolados diferiram entre si nos meios de cultivo testados, exceto em cloreto de amônio no qual o *C. truncatum* e *C. musae* não diferiram e em molibdato de amônio onde os isolados não diferiram entre si e nem do controle. O molibdato de amônio foi excluído do experimento seguintes de estresse nutricional com fontes de nitrogênio em meio líquido por inibir o crescimento fúngico.

Tabela 8 - Diâmetro médio (cm) das colônias de *Colletotrichum* cinco dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	Cs	Ct	Cm
Molibdato de Amônio	0 Aa	0,1 Aa	0 Aa
Cloreto de Amônio	2,05 Bb	1,4 Ba	1,1 Ba
Nitrato de potássio	6,7 Eb	4,5 Da	7,95 Dc
Asparagina	6,3 Db	3,45 Ca	6,9 Cc
Extrato de levedura	5,5 Cb	4,95 Ea	7,95 Dc
			C.V.%=4,33

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

A produção de esporos variou de 0 a  $51,75 \times 10^5$  esporos/mL (Tabela 9). A esporulação de *C. siamense* e de *C. musae* sofreu influência da fonte de nitrogênio. *C. siamense* esporulou em meio com nitrato de potássio e em meio com asparagina, havendo diferença significativa entre os dois meios. *C. musae* produziu a maior quantidade de esporos que foi registrada no meio com extrato de levedura e não houve esporulação no meio com molibdato de amônio. *C. truncatum* não esporulou em nenhum meio testado. Por inibir a esporulação fúngica o meio com molibdato de amônio foi excluído do experimento de estresse nutricional com fontes de nitrogênio em meio líquido.

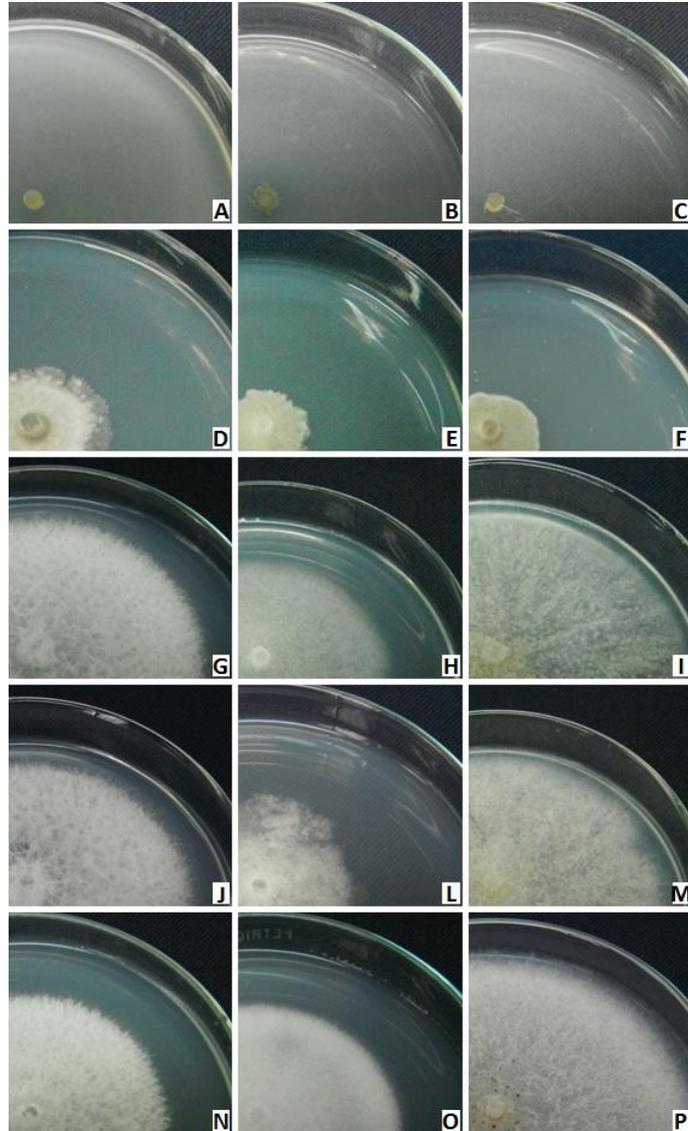
Tabela 9 – Esporulação média  $10^5$  esporos/mL de espécies de *Colletotrichum* dez dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Molibdato de amônio	0 Aa	0 Aa	0 Aa
Cloreto de amônio	0 Aa	0 Aa	2,15 Bb
Nitrato de potássio	1,3 Ba	0 Aa	7,5 Cb
Asparagina	0,1 Aa	0 Aa	9,55 Cb
Extrato de levedura	0 Aa	0 Aa	51,75 Db
			C.V.%=9,96

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

As culturas crescidas na combinação de sacarose com fontes de nitrogênio produziram micélio esbranquiçado a amarelado (Figura 7). As fontes orgânicas asparagina e extrato de levedura promoveram o desenvolvimento maior de micélio aéreo que o observado para as fontes inorgânicas nitrato de potássio e cloreto de amônio. Não foi possível registrar aspectos morfo-culturais no cultivo sólido contendo meio com molibdato de amônio, pois houve inibição do crescimento micelial.

Figura 7 - Crescimento micelial aos 5dai em sacarose sob estresse de fontes de nitrogênio. Nas linhas da esquerda para a direita *Cs*, *Ct* e *Cm* respectivamente. A-C Molibdato de amônio, D-F Cloreto de amônio, G-I Nitrato de potássio, J-M Asparagina, N-P Extrato de levedura.



### 3.3.5. Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose no meio líquido

O acúmulo de massa fresca variou de 3,76 a 10,93 gramas (Tabela 10). Os menores acúmulos ocorreram nos cultivos com cloreto de amônio que diferiu significativamente das demais fontes de nitrogênio. Os maiores acúmulos de massa fresca foram registrados nos cultivos com nitrato de potássio (*Cs* e *Ct*) e com asparagina (*Cm*). Não houve diferença significativa entre a massa fresca de *C. musae* nos cultivos com nitrato de potássio, asparagina e extrato de levedura. Comparando os isolados dentro do tratamento fonte de nitrogênio, não foi observado diferenças para cloreto de amônio e o isolados *Cs* e *Ct* tiveram maior acúmulo de matéria fresca nos meios com nitrato de potássio, asparagina e extrato de levedura.

Tabela 10 - Massa fresca (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	4,59 Aa	3,76 Aa	3,94 Aa
Nitrato de potássio	10,93 Cb	10,67 Db	8,70 Ba
Asparagina	6,65 Ba	6,63 Ba	8,72 Bb
Extrato de levedura	9,28 Cb	8,17 Cab	7,79 Ba
			C.V.%=9,72

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

Avaliando o acúmulo de massa seca, o menor acúmulo aconteceu no cultivo com cloreto de amônio e o maior aconteceu no cultivo com nitrato de potássio (*Cs* e *Ct*) e com extrato de levedura (*Cm*) (Tabela 11). Não houve diferença significativa na massa seca dos isolados em cada fonte de nitrogênio.

Tabela 11 - Massa seca (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	Cs	Ct	Cm
Cloreto de amônio	0,11 Aa	0,10 Aa	0,07 Aa
Nitrato de potássio	3,41 Bbc	4,14 Cc	2,26 Bb
Asparagina	0,81 Aab	0,79 Aab	1,91 Bb
Extrato de levedura	3,19 Bb	1,99 Bb	2,81 Bb
			C.V.%=9,29

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

A variação de massa ficou entre 3,65 e 7,52 gramas (Tabela 12). As menores variações ocorreram nos cultivos com cloreto de amônio e as maiores com nitrato de potássio (Cs e Ct) e com asparagina (Cm). Não houve diferença significativa na variação de massa de *C. musae* nos cultivos com nitrato de potássio, asparagina e extrato de levedura. *C. musae* diferiu dos demais isolados somente no cultivo com extrato de levedura, onde exibiu a menor variação de massa.

Tabela 12 – Variação de massa (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	Cs	Ct	Cm
Cloreto de amônio	4,47 Aa	3,65 Aa	3,85 Aa
Nitrato de potássio	7,52 Bb	6,53 Cab	6,44 Ba
Asparagina	5,83 Aa	5,84 Ba	6,81 Ba
Extrato de levedura	6,09 Bb	6,18 Cb	4,98 Ba
			C.V.%=9,45

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

A produção de esporos variou de 0 a  $70,62 \times 10^5$  esporos /mL (Tabela 13). Apenas a esporulação de *C. musae* sofreu influência da fonte de nitrogênio, para este isolado a maior

quantidade de esporos foi registrada no meio com extrato de levedura. *C. siamense* não esporulou e *C. truncatum* esporulou apenas no meio com nitrato de potássio sem diferir significativamente dos demais meios e do controle.

Tabela 13 - Esporulação média  $10^5$  esporos/mL de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	0 Aa	0 Aa	0,02 Aa
Nitrato de potássio	0 Aa	0,90 Aa	25,12 Cb
Asparagina	0 Aa	0 Aa	4,52 Bb
Extrato de levedura	0 Aa	0 Aa	70,62 Db
			C.V.%=16,66

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

Sob estresse nutricional da combinação sacarose com fontes de nitrogênio os isolados exibiram variações de pH expressivas (Tabela 14). O cultivo com cloreto de amônio exibiu a maior acidificação, enquanto que o cultivo com nitrato de potássio promoveu a maior alcalinização. O cultivo com extrato de levedura não variou significativamente o pH inicial 5,0. Em função da distribuição anormal dos dados foi aplicado o estimador de densidade Kernel o qual apontou para uma ajuste com a distribuição gaussiana. Os valores estimados para o modelo foram então transformados em SQDR ( $Y_{Gauss+1}$ ).

Tabela 14 – Variação de pH do secretoma de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	-2,64 Aa	-2,7 Aa	-2,67 Aa
Nitrato de potássio	2,32 Db	2,17 Db	2,34 Db
Asparagina	-1,32 Bb	-2,29 Aa	-1,46 Bab
Extrato de levedura	0,2 Cbc	-0,82 Ca	0,44 Cc
			C.V.%=-2,66

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR ( $Y_{Gauss+1}$ ).  
*Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

A produção de proteínas variou de 0,363 a 14,120  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabela 15). As menores quantidades de proteínas foram registradas nos cultivos com cloreto de amônio e as maiores foram produzidas com fontes de nitrogênio diferentes para cada isolado. *C. siamense* produziu mais proteínas em meio com asparagina, *C. truncatum* em meio com nitrato de potássio e *C. musae* em meio com extrato de levedura.

Tabela 15 - Produção de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sacarose.

Fontes de nitrogênio	Cs	Ct	Cm
Cloreto de amônio	1,851 Aa	0,491 Aa	0,363 Aa
Nitrato de potássio	7,446 Bb	4,044 Bab	2,615 Aa
Asparagina	14,120 Cc	0,719 ABab	2,947 Ab
Extrato de levedura	4,120 ABa	3,455 ABa	7,370 Bb
			C.V.%=25,91

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

### 3.3.6. Lesão tecidual sob estresse de fontes de nitrogênio em sacarose.

As lesões produzidas pelo secretoma de *Colletotrichum* spp. nas folhas de *S. lycopersicum* foram variadas (Figura 8). O isolado Cs ocasionou lesões necróticas em todos os tratamentos. Clorose periférica foi observada nos tratamentos com cloreto de amônio e com asparagina. No tratamento com nitrato de potássio observou-se lesões necróticas de coloração esbranquiçada e no tratamento com extrato de levedura foram observadas lesões necróticas de coloração amarronzada.

O fungo *C. truncatum* ocasionou lesões em todos os tratamentos exceto naquele que continha extrato de levedura. Houve necrose de coloração esbranquiçada no tratamento com cloreto de amônio, necrose semelhante e murcha parcial no tratamento com nitrato de potássio e necrose de coloração amarronzada no tratamento com asparagina. O isolado Cm ocasionou lesões somente no tratamento com nitrato de potássio estas foram necroses esbranquiçadas.

As lesões produzidas pelo secretoma livre de esporos nas folhas de *P. lunatus* são de coloração amarronzada e concentram-se na região perfundida (Figura 9).

Figura 8 – Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sacarose. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, Cs, Ct e Cm. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura.

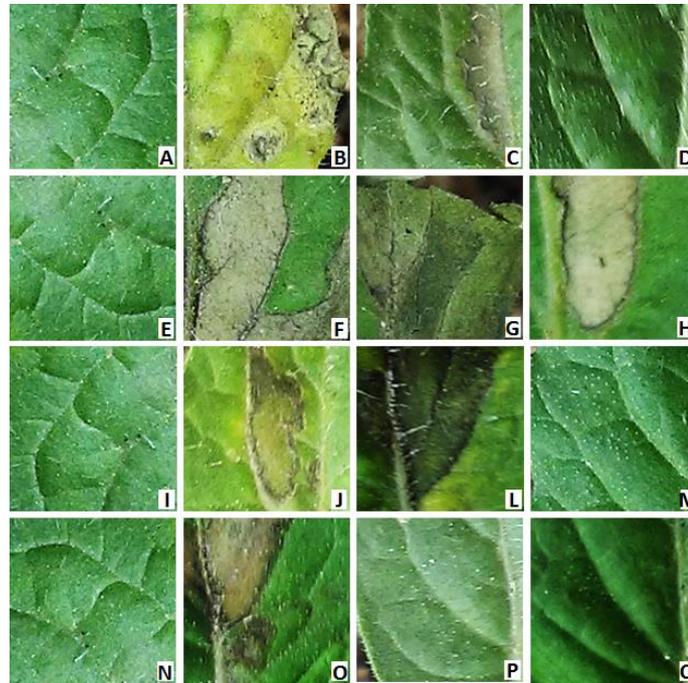
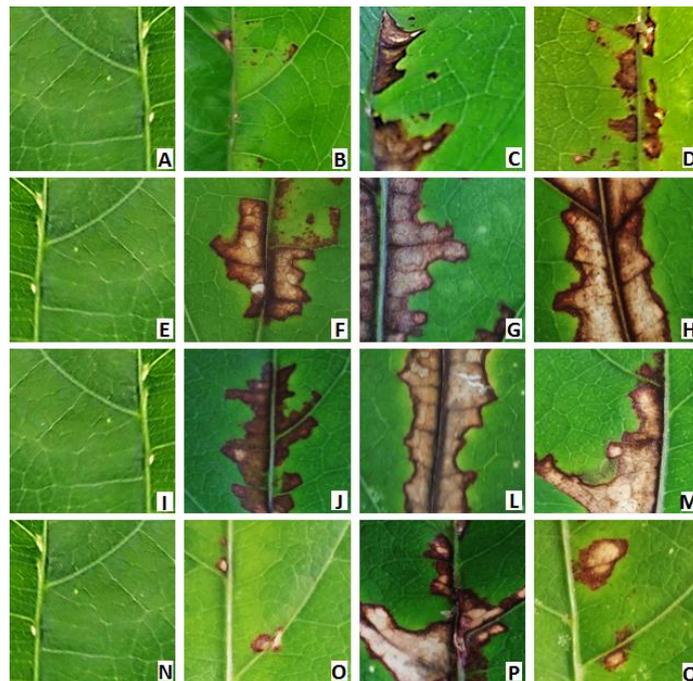


Figura 9 - Lesões induzidas em folhas de *P. lunatus* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sacarose. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, Cs, Ct e Cm. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura.



A infiltração com secretoma de *C. truncatum* exibe uma área foliar lesionada compatível com a área infiltrada em todos os tratamentos, os demais isolados exibem áreas foliares danificadas menores que *Ct* especialmente nos tratamentos com cloreto de amônio e extrato de levedura. Os meios com nitrato de potássio e com asparagina não mostraram variação expressivas entre as lesões ocasionadas pelos diferentes isolados.

### 3.3.7. Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol no meio sólido

A fonte de nitrogênio influenciou o crescimento micelial em meio sólido, o qual variou de 1,1 a 7,35 centímetros (Tabela 16). O meio com extrato de levedura promoveu o maior diâmetro médio de colônia no quinto dia após a inoculação (5 dai) Os menores diâmetros foram registrado para *C. siamense* no meio asparagina, *C. truncatum* no meio cloreto de amônio e para *C. musae* no meio molibdato de amônio.

Os isolados não diferiram entre si no meio com asparagina. O *C. musae* exibiu o menor diâmetro nos meios testados, exceto no meio com extrato de levedura no qual promoveu o maior crescimento.

Tabela 16 - Diâmetro médio (cm) das colônias de *Colletotrichum* cinco dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	Cs	Ct	Cm
Molibdato de Amônio	2,15 Ab	2,5 Bb	1,1 Aa
Cloreto de Amônio	2,9 Bb	1,75 Aa	1,7 Ba
Nitrato de potássio	4,95 Cc	4,15 Cb	3,65 Ca
Asparagina	2 Ab	1,8 Aab	1,25 ABa
Extrato de levedura	6,55 Da	6,5 Da	7,35 Db
			C.V.%=11,22

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). Cs = *Colletotrichum siamense*; Ct = *C. truncatum*; Cm = *C. musae*.

A produção de esporos variou de 0 a  $3 \times 10^5$  esporos/mL (Tabela 17). A esporulação sofreu influência da fonte de nitrogênio, evidenciada pela maior quantidade de esporos registrada no meio com extrato de levedura (*Cm*). *C. truncatum* esporulou somente no meio com nitrato de

potássio e *C. siamense* somente no meio com extrato de levedura, porém não diferiram dos demais meios ou do controle.

Tabela 17 – Esporulação média  $10^5$  esporos/mL de espécies de *Colletotrichum* dez dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Molibdato de amônio	0 Aa	0 Aa	0,20 Aa
Cloreto de amônio	0 Aa	0 Aa	1,05 Bb
Nitrato de potássio	0 Aa	0,65 Bb	0,10 Aa
Asparagina	0 Aa	0 Aa	1,15 Bb
Extrato de levedura	0,10 Aa	0 Aa	3,00 Cb
			C.V.%=11,83

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

As culturas crescidas na combinação sorbitol com fontes de nitrogênio variaram na coloração (Figura 10). O Meio com molibdato de amônio produziu micélio mais amarelado que os demais meios. Houve redução na quantidade de micélio aéreo nos meios com nitrato de potássio e asparagina quando comparado com as combinações sacarose com fontes de nitrogênio. *C. truncatum* produziu menos micélio aéreo que os demais isolados em todas as fontes de nitrogênio testadas.

### 3.3.8. Estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol no meio líquido

O acúmulo de massa fresca variou de 1,09 a 6,66 gramas (Tabela 18). Os menores acúmulos ocorreram nos cultivos com asparagina (*Cs* e *Ct*) e com nitrato de potássio (*Cm*). Os maiores acúmulos foram registrados no meio com extrato de levedura que diferiu significativamente dos demais. *C. siamense* proporcionou os maiores acúmulos.

Figura 10 - Crescimento micelial aos 5dai em sorbitol sob estresse de fontes de nitrogênio. Nas linhas da esquerda para a direita *Cs*, *Ct* e *Cm* respectivamente. A-C Molibdato de amônio, D-F Cloreto de amônio, G-I Nitrato de potássio, J-M Asparagina, N-P Extrato de levedura.

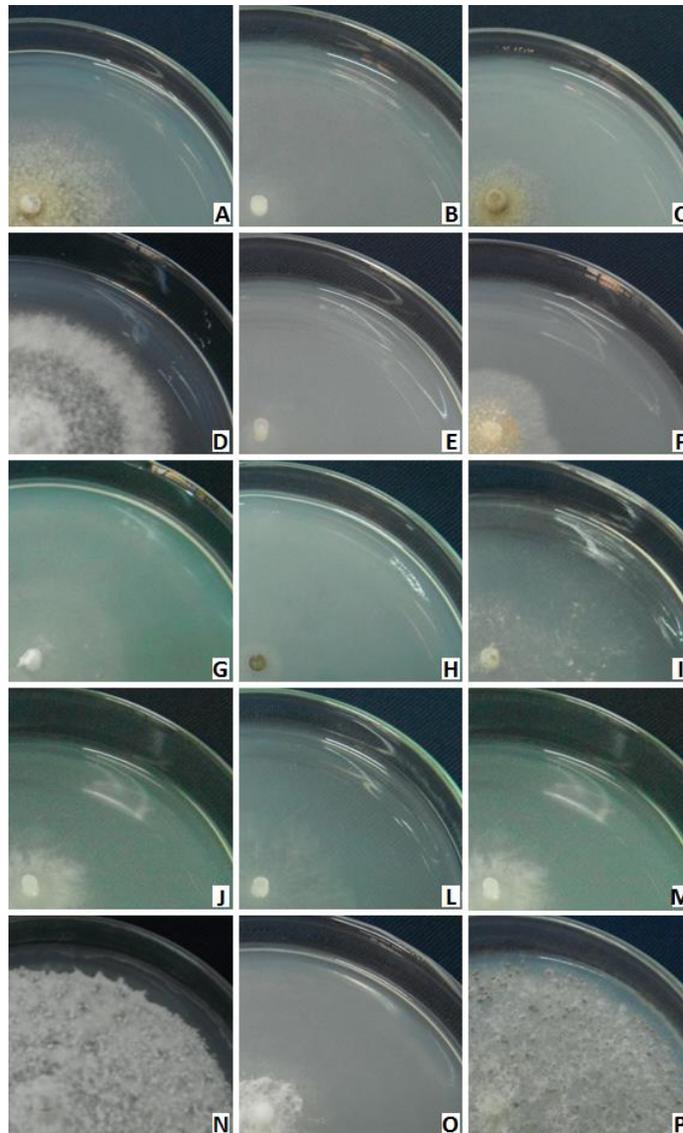


Tabela 18 - Massa fresca (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	5,53 Bb	1,95 ABa	2,54 Aa
Nitrato de potássio	4,77 ABc	1,66 ABab	2,06 Ab
Asparagina	2,99 Ac	1,09 Aab	2,69 Abc
Extrato de levedura	6,66 Bb	3,53 Ba	6,39 Bb
			C.V.%=28,11

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

O acúmulo de massa seca variou de 0 a 1,57 gramas (Tabela 19). Os menores acúmulo foram registrados para os cultivos com asparagina (*Ct* e *Cm*) e com cloreto de amônio (*Cs*). Os maiores acúmulos foram observados nos cultivos com extrato de levedura (*Cs* e *Cm*) e com cloreto de amônio (*Ct*). *C. truncatum* exibiu os menores acúmulos não diferindo significativamente entre as fontes de nitrogênio e nem do controle.

Tabela 19 - Massa seca (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	0,30 Bb	0,07 Aa	0,09 Aa
Nitrato de potássio	1,17 ABb	0,04 Aa	0,06 Aa
Asparagina	0,66 Aa	0 Aa	0,01 Aa
Extrato de levedura	1,57 Bb	0,06 Aa	0,90 Bb
			C.V.%=8,99

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

A variação de massa ficou entre 1,13 e 5,49 gramas (Tabela 20). As menores variações ocorreram no cultivo com asparagina (*Cs* e *Ct*) e no cultivo com nitrato de potássio (*Cm*). As

maiores variações foram registradas nos cultivos com extrato de levedura o qual diferiu significativamente dos demais.

Tabela 20 – Variação de massa (g) de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	4,22 BCb	1,87 Aa	2,45 Aa
Nitrato de potássio	3,59 ABb	1,62 Aa	2,00 Aa
Asparagina	2,67 Ab	1,13 Aa	2,69 Ab
Extrato de levedura	5,09 Cb	3,47 Ba	5,49 Bb
			C.V.%=25,62

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

A produção de esporos variou de 0 a  $1,3 \times 10^5$  esporos/mL (Tabela 21). Houve influência da fonte de nitrogênio sobre a esporulação de *C. musae* e *C. siamense*. O primeiro exibiu a maior esporulação no meio com asparagina. *C. siamense* esporulou mais em cloreto de amônio.

Tabela 21 - Esporulação média  $10^5$  esporos/mL de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	1,30 Bb	0 Aa	0,02 Aa
Nitrato de potássio	0,65 ABa	0 Aa	0,10 Aa
Asparagina	0,90 ABab	0 Aa	1,15 Bb
Extrato de levedura	0 Aa	0,45 Aa	0,77 ABa
C.V.%=16			

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

Sob estresse nutricional da combinação sorbitol com fontes de nitrogênio os isolados exibiram variações de pH expressivas (Tabela 22). O cultivo com cloreto de amônio exibiu a maior acidificação, enquanto que os cultivos com nitrato de potássio (*Cs*) e asparagina (*Ct* e *Cm*) promoveram as maiores alcalinizações. O cultivo com extrato de levedura não variou significativamente o pH inicial 5,0 (*Cs* e *Cm*). Em função da distribuição anormal dos dados foi aplicado o estimador de densidade Kernel o qual apontou para uma ajuste com a distribuição gaussiana. Os valores estimados para o modelo foram então transformados em SQDR ( $Y_{\text{Gauss}+1}$ ).

Tabela 22 – Variação de pH do secretoma de espécies de *Colletotrichum* 21 dias após inoculação sob estresse nutricional de fontes de nitrogênio em sorbitol.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de amônio	-3,52 Aa	-2,62 Aa	-2,28 Aa
Nitrato de potássio	1,61 Cc	0,44 Bab	0,62 Bbc
Asparagina	1,50 Cb	2,84 Cc	2,74 Cc
Extrato de levedura	-0,74 Ba	1,99 Cc	0,96 BCc
			C.V.%=-4,6

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (YGauss+1). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

A produção de proteínas variou de 0 a 7,592  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (Tabela 23). As menores quantidades de proteínas foram registradas no cultivo com cloreto de amônio, enquanto que as maiores foram observadas nos cultivos com extrato de levedura (*Cs* e *Cm*) e asparagina (*Ct*). A produção de proteínas por *C. truncatum* não diferiu significativamente entre as fontes de nitrogênio testadas. *C. siamense* exibiu a maior produção de proteínas quando comparado aos demais isolados.

Tabela 23 – Produção de proteínas ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) na combinação de sorbitol com fontes de nitrogênio.

Fontes de nitrogênio	<i>Cs</i>	<i>Ct</i>	<i>Cm</i>
Cloreto de Amônio	1,151 Ab	0,121 Aa	0,252 Aa
Nitrato de potássio	2,300 Bb	0 Aa	0,415 Aa
Asparagina	4,435 Cc	0,188 Aab	0,503 Ab
Extrato de levedura	7,592 Dc	0,118 Aa	1,676 Bb
			C.V.%=10,28

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1). *Cs* = *Colletotrichum siamense*; *Ct* = *C. truncatum*; *Cm* = *C. musae*.

### 3.3.9. Lesão tecidual sob estresse de fontes de nitrogênio em sorbitol.

As lesões ocasionadas pelo secretoma nas folhas de *S. lycopersicum* foram menos diversas que as observadas no experimento anterior, onde foram combinadas fontes de nitrogênio a sacarose (Figura 11). No presente experimento *C. siamense* ocasionou lesões necróticas de coloração amarronzada no tratamento com cloreto de amônio e de coloração esbranquiçada no tratamento com nitrato de potássio.

O fungo *C. truncatum* ocasionou pequenas lesões necróticas compatíveis com o ponto de introdução da agulha durante a perfusão, essas lesões foram de coloração esbranquiçada no tratamento com cloreto de amônio e de coloração amarronzada no tratamento com extrato de levedura. O isolado *Cm* não ocasionou nenhuma lesão no tecido foliar de *S. lycopersicum*.

As lesões produzidas pelo secretoma livre de esporos nas folhas de *P. lunatus* são de coloração marrom e concentram-se na região perfundida (Figura 12). Os secretomas do três isolados produzidos no meio com nitrato de potássio causaram as menores lesões entre os tratamentos, essas lesões foram representadas por pequenos pontos necróticos próximos ao local de perfusão.

O isolado *Cs* causou lesões necróticas de coloração amarronzada no tratamento com cloreto de amônio, as lesões causadas por esse isolado nos tratamentos com asparagina e extrato de levedura foram progressivamente e respectivamente maiores e de coloração esbranquiçada.

*Colletotrichum truncatum* ocasionou pequenas lesões necróticas restritas a área perfundida. O isolado *Cm* seguiu o padrão descrito para *Cs*, lesões necróticas progressivamente maiores e mais esbranquiçadas, dos tratamentos com cloreto de amônio ao com extrato de levedura, excetuando o tratamento com nitrato de potássio.

Figura 11 - Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sorbitol. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, *Cs*, *Ct* e *Cm*. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura.

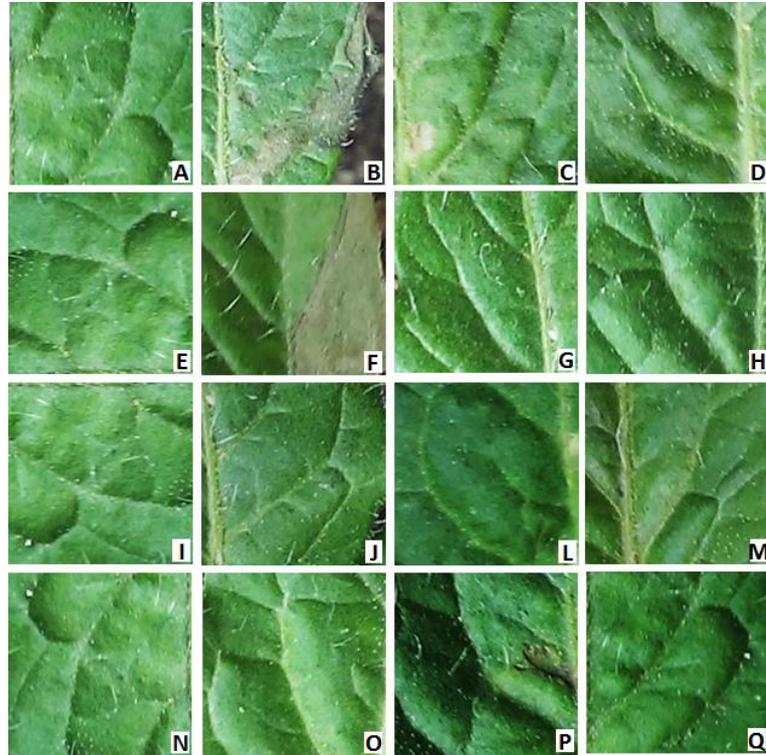
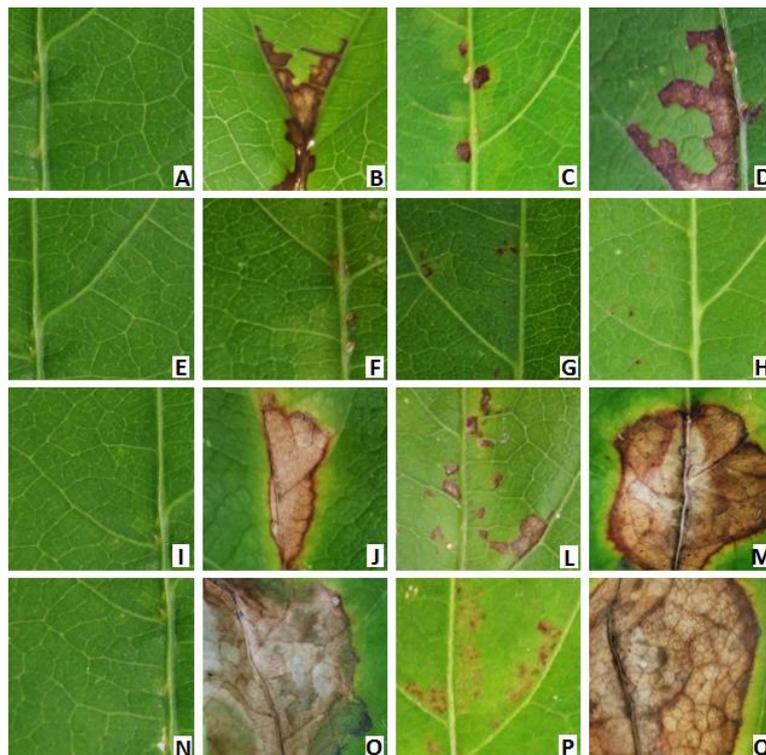


Figura 12 - Lesões induzidas em folhas de *P. lunatus* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam fontes de nitrogênio em sorbitol. Nas colunas da esquerda para a direita: Controles, *Cs*, *Ct* e *Cm*. A – D cloreto de amônio, E-H nitrato de potássio, I-M asparagina, N-Q extrato de levedura.



### 3.4. Discussão

A disponibilidade, a fonte e a concentração de carbono e nitrogênio são fatores que afetam a fisiologia dos fungos, o impacto dessas variáveis é refletido sobre as taxas de crescimento, esporulação, cor e textura micelial e abundância de ECP's. (JUN et al., 2013; MAJEAU et al., 2010).

O experimento com quatro fontes de carbono mostrou que a sacarose teve impacto negativo na fisiologia fúngica quando comparada aos demais tratamentos, fato atestado pelos menores crescimento micelial e esporulação registrados. Por outro lado a fonte de carbono sorbitol impactou positivamente a fisiologia das espécies fúngicas promovendo as maiores taxas absolutas de crescimento micelial e esporulação. Comparado ao dissacarídeo sacarose, o poliálcool sorbitol é uma molécula mais simples com metade dos carbonos e sem os radicais hidroxila presentes na sacarose. Logo é facilmente absorvido e metabolizado.

De forma geral a presença do substrato, neste caso carboidratos, promove uma regulação transcricional da enzima responsável por metaboliza-lo como demonstrado por (JUHASZ et al., 2005; STRICKER et al., 2008) em *Trichoderma reesi* e *Aspergillus niger*. Ainda em *T. reesi* a transcrição dos principais genes de celulasas era induzida não somente pela presença da celulose, mas também por uma gama de mono e dissacarídeos como a xilose, lactose e celobiose (NOGAWA et al., 2001; SALOHEIMO et al., 1997), no entanto a indução dessas enzimas é reduzida na presença de uma fonte preferencial de carbono, como por exemplo a glicose e a frutose. Nota-se uma preferência pelo consumo de fontes de carbono mais simples, as quais não necessitam de incremento na transcrição de ECP's para seu aproveitamento.

Uma vez que o catabolismo de fontes simples de carbono dispensa a biossíntese de ECP's enzimáticas, e portanto requer um menor gasto energético, o microrganismo pode reverter essa energia para o crescimento e reprodução. Isso vai de encontro ao observado por Patel e Gupte (2016), uma correlação linear entre a biomassa e a produção da enzima lacase. Isso pode ser explicado pelo fato de que a lacase, além de estar associada com a degradação de lignina tem numerosas funções estruturais para o fungo tais como esporulação, produção de pigmentos e desenvolvimento de corpos de frutificação (THURSTON, 1994). Portanto, a correlação não explica a baixa produção de ECP's em sorbitol, mesmo com a alta produção de biomassa.

Assim, tanto o maior crescimento e esporulação quanto a menor produção de ECP's apontam no sentido de que a fonte de carbono sorbitol é preferencialmente consumida por *Colletotrichum* spp.

Sabendo que a sacarose promove impacto negativo sobre o desenvolvimento fúngico e o sorbitol positivo comparado às demais fontes de carbono testadas, ambos foram utilizados

combinados às fontes orgânicas e inorgânicas de nitrogênio. Observou-se então que as taxas de crescimento micelial e esporulação foram maiores na presença de extrato de levedura, como fonte de nitrogênio, e menores para cloreto de amônio. Os dados apontam para o melhor aproveitamento de fontes orgânicas do que inorgânicas de nitrogênio.

Jackson e Bothast (1990), e Patel e Gupte (2016) concluíram que meios de cultivo com grandes quantidade de carbono promovem o crescimento micelial, e que concentrações menores de carbono combinadas com fontes complexas e orgânicas de nitrogênio incrementam a esporulação de *Colletotrichum* sp. Dados semelhantes também foram aqui observados, não somente a esporulação é incrementada na presença de baixas concentrações de carbono combinadas a fontes complexas e orgânicas de nitrogênio, mas também o crescimento micelial de *Colletotrichum* spp.

Ainda sobre esporulação, Jackson e Bothast (1990) observaram que a resposta ao carbono não é universal entre espécies diferentes de *Colletotrichum*, enquanto concentrações superiores 2,5% de carbono inibiram a esporulação de *C. truncatum*, o mesmo não acontecia com *C. gloeosporioides* f sp. *aeschynomene*. Dado semelhante foi observado no presente trabalho, nos tratamentos que associam sacarose e sorbitol a fontes de nitrogênio.

Nessa fase inicial de infecção os fungos fitopatogênicos precisam superar a restrição de nitrogênio por ainda não acessar os nutrientes contidos no hospedeiro (SNOEIJER et al., 2000) contando apenas com suas reservas energéticas para iniciar o espólio das fontes complexas de carbono e nitrogênio do hospedeiro.

Diversos autores (PATEL et al., 2009; PATEL; GUPTE, 2016) relatam que substratos complexos como a palha e o farelo de trigo, além da cascas de frutos como o tamarindo, são os melhores substratos para a produção de enzimas em meio sólido, foram relatados incrementos de até 59 vezes a produção enzimática em meio suplementado com os substratos complexos. Isso demonstra que a falta de carboidratos pode ser contornada utilizando suas reservas energéticas por glicogenólise ou gliconeogenólise, contudo a restrição de nitrogênio deve ser superada dispondo apenas de substratos complexas, que para fitopatógenos é a superfície do hospedeiro. Essa condição é similar a encontrada no tratamento experimental que combinou sorbitol e extrato de levedura. Curiosamente nesse tratamento observou-se a maior produção de ECP's.

Vários genes, tanto de bactérias como de fungos, são induzidos especificamente durante o estresse de nitrogênio e/ou durante as fases iniciais de infecção ao hospedeiro. (DONOFRIO et al., 2006) Tal estresse desencadeia a síntese de enzimas que catabolizam o nitrogênio contido no hospedeiro e o disponibiliza para o patógeno.

O amônio, junto a glutamina, são as formas preferenciais de absorção de nitrogênio pelos fungos, quando ausentes podem ser catabolizadas de compostos inorgânicos como por exemplo o nitrato por reduções sequenciais. (PEREIRA et al., 2003) Assim há o acúmulo de amônio extracelular que eleva o pH do ambiente, os resultados obtidos para variação de pH ( $\Delta$ pH) mostram tal alcalinização, exceto no que combinava sacarose com nitrato de potássio, sacarose com asparagina e o que combinava sorbitol e cloreto de amônio. Em outros termos uma fonte complexa de carbono com uma inorgânica ou simples de nitrogênio e uma simples de carbono com uma inorgânica de nitrogênio.

As menores variações de pH traduzem um pH~5, pois os meios líquidos foram ajustados para tal pH no início do ensaio. Os tratamentos associados a estes valores de pH exibiram altas taxas de produção micelial e de ECP's, corroborando com vários estudos que demonstram a máxima produção micelial e consequente máxima produção proteica em cultivos com pH 5. (CHHAYA; GUPTE, 2013; PATEL; GUPTE, 2016; RAVIKUMAR et al., 2012). Por outro lado as baixas produções de biomassa e de ECP's e a acidificação observada nos cultivos contendo cloreto de amônio indicam que essa fonte de nitrogênio foi facilmente absorvida pelos fungos, assim não foi necessário incremento de biomassa para a biossíntese de enzimas que catabolizam fontes complexas de nitrogênio acumulando amônio e consequentemente alcalinizando o meio. (PEREIRA et al., 2003)

O ambiente alcalino é necessário às atividade e expressão de algumas enzimas incluindo a pectato liase codificada pelo gene *pelB*, um fator de virulência para *C. gloeosporioides* em abacateiro (DRORI et al., 2003; YAKOBY et al., 2001). As ECP's muitas vezes são capazes de produzir sintomas característicos das doenças, como observado por Talbot et al. (1997) estudando os produtos de secreção de *Magnaporthe grisea* sob estresse de nitrogênio.

Entre as ECP's estão enzimas envolvidas com a degradação de carboidratos, proteases, eliciadores e outras de função desconhecida. (PAPER et al., 2007; PHALIP et al., 2005; YANG et al., 2012) Por isso lesões teciduais são formadas durante o desenvolvimento da doença ou quando o secretoma produzido *in vitro* é perfundido no tecido vegetal.

Analisando qualitativamente as lesões teciduais em folhas de *Solanum lycopersicum* (*Sl*) e *Phaseolus lunatus* (*Pl*) geradas após a perfusão venal dos secretomas produzidos sob estresse nutricional, observou-se que *Sl* conserva a especificidade observada no teste de patogenicidade sendo lesionado apenas por seu patógeno adaptado *Colletotrichum siamense* crescido com a fonte de carbono sorbitol.

Por outro lado em *Pl* essa especificidade entre patógeno e hospedeiro foi quebrada especialmente quando foi perfundido os secretomas obtidos com Amido. Sabe-se que a

composição do secretoma e a secreção de efetores e outras proteínas de fungos hemibiotróficos sofre influência e regulação dos sinais oriundos da planta hospedeira. (CHAUDHARI et al., 2014; McCOTTER et al., 2016; VLEESHOUWERS; OLIVER, 2014) Isso pode explicar o comportamento diferenciado entre *Sl* e *Pl* perfundidos com secretoma produzido *in vitro*, apontando para uma baixa regulação por *Sl* e alta por *Pl*. Essa disparidade entre esse resultado e o observado no teste de patogenicidade pode ser resolvida com a produção do secretoma nos tecidos do hospedeiro.

A ideia de que as fontes simples de nutrientes são melhor aproveitadas e contribuem melhor com a expressão da fisiologia normal do fungo é reforçada com os dados de respostas tecidual ao cultivo com sorbitol e os de patogenicidade dos isolados. De forma contrária foi o tratamento com sacarose, que mostrou lesões nos tecidos de *Sl* e *Pl* não importando a especificidade entre patógeno e hospedeiro. Resposta ainda mais discrepante foi observada no tratamento com Amido, um polissacarídeo mais complexo que a sacarose, o qual não proporcionou as lesões esperadas de *C. trumcatum* em *Pl*, seu patógeno adaptado e ainda lesionou as folhas de *Sl* perfundidas.

As lesões teciduais podem ser resposta do hospedeiro a presença ou ação de um patógeno ou ainda a efetiva ação do patógeno sobre o hospedeiro. Portanto a presença de lesões pode indicar a presença e atividade de proteínas relacionadas à patogênese, por exemplo enzimas degradadoras de parede celular. Contudo a concentração de proteínas não parece estar relacionada com a ocorrência de lesões, visto que o tratamento com amido ocasionou a maior produção de proteínas e mesmo assim as lesões teciduais ocasionadas não refletem o comportamento natural das espécies de *Colletotrichum* testadas.

Percebe-se ainda que na presença de nitrogênio há o incremento da quantidade de proteínas produzidas. As fontes orgânicas proporcionam as maiores produções de proteínas principalmente quando associadas ao sorbitol. As quantidade de proteína nas combinações de sorbitol com as fontes de nitrogênio mostram a relação entre a complexidade da fonte de nitrogênio e a quantidade de ECP's. Ao passo que cloreto de amônio produz as menores quantidade de proteínas o nitrato de potássio, a asparagina e o extrato de levedura mostram nessa ordem crescente as maiores taxas de produção.

A preferência de fungos por amônio e glutamina (CADDICK et al., 1994; MARZLUF, 1997) explica as quantidade de proteínas produzidas com a combinação sorbitol e fontes de nitrogênio. A complexidade das fontes requer uma maior quantidade de passos catabólicos para chegar a amônio, logo uma maior quantidade de ECP's é observada na combinação sorbitol e extrato de levedura.

As lesões teciduais geradas pelos secretomas produzidos em meio de cultivo que associavam fontes de carbono com fontes de nitrogênio parecem não estar relacionadas somente a quantidade de proteínas produzidas, mas também à composição do meio de cultivo. Os resultados evidenciam que a especificidade ao hospedeiro foi mantida nas associações sacarose extrato de levedura e sorbitol nitrato de potássio, ou seja, fontes complexas de carbono e nitrogênio associadas e fontes mais simples de carbono e nitrogênio associadas.

### **3.5. Conclusões**

A fonte de carbono sacarose impactou negativamente a fisiologia dos isolados, enquanto que sorbitol a impactou positivamente. Assim como as fontes inorgânicas de nitrogênio impactaram negativamente o desenvolvimento fúngico e as fontes orgânicas positivamente.

As combinações sacarose nitrato de potássio e sorbitol asparagina registraram alcalinização enquanto que sacarose e sorbitol associados a cloreto de amônio registraram acidificação. A combinação sorbitol extrato de levedura sustentou a maior produção de proteínas e sorbitol cloreto de amônio a menor.

O tratamento sorbitol com nitrato de potássio produziu lesões teciduais compatíveis com o teste de patogenicidade. Sorbitol combinado com nitrato de potássio simula melhor o estresse nutricional enfrentado nas fases iniciais de infecção.

A inespecificidade do patógeno observada nos ensaios de perfusão venal de secretoma, aponta para a importância das fases pré-penetração na patogênese e na defesa vegetal. Provavelmente os fatores essenciais para a especificidade entre patógeno e hospedeiro atuam nessa fase, sem os quais a mudança de hospedeiro foi permitida.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, E. et al. Atomic force microscopy: a tool for studying biophysical surface properties underpinning fungal interactions with plants and substrates. **Methods Molecular Biology**. v.835, p.151–64, 2012.
- AMARAL, A.M. et al. Defining the Predicted Protein Secretome of the Fungal Wheat Leaf Pathogen *Mycosphaerella graminicola*. **Plos One**. v.12, n.7, 2012.
- ARIE, T. et al. Tomato as a model plant for plant-pathogen interactions. **Plant Biotechnology**. v.24, p.135-147, 2007.
- BENT, A.F.; MACKEY, D. Elicitors, Effectors and R Genes. **Annual Review of Phytopathology**. v.45, p.399-436, 2007.
- BERGER, S. et al. Complex regulation of gene expression, photosynthesis and sugar levels by pathogen infection in tomato. **Physiologia Plantarum**. v.122, p.419–428, 2004.
- BERGER, S.; SINHA, A. K.; ROITSCH, T. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant–pathogen interactions. **Journal of Experimental Botany**. v.58, p.4019–4026, 2007.
- BHADARIA, V. et al. EST mining identifies proteins putatively secreted by the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **BMC Genomics**. v.12, p.327-343, 2011.
- BOER, V.M. et al. The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. **Journal of Biological Chemistry**. v.278, p.3265–3274, 2003.
- BROWN, S.H. et al. Differential protein expression in *Colletotrichum acutatum*: changes associated with reactive oxygen species and nitrogen starvation implicated in pathogenicity on strawberry. **Molecular Plant Pathology**. v.9, p.171–190, 2008.
- BRUNDRETT, M. Diversity and classification of mycorrhizal associations. **Biological Reviews**. v.79, p.473–495, 2004.
- BUSCOT, F. et al. Recent advances in exploring physiology and biodiversity of ectomycorrhizas highlight the functioning of these symbioses in ecosystems. **New Phytologist**. v.24, p.601–614, 2000.
- CADDICK, M.X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.64, p.169-177, 1994.
- CHAUDHARI, P. et al. Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. **Virulence**. v.5, p.703–709, 2014.
- CHHAYA, U.; GUPTE, A. Effect of different cultivation conditions and inducers on the production of laccase by the litter-dwelling fungal isolates *Fusarium incarnatum* LD-3 under solid substrate fermentation. **Annals Microbiology**. v.63, p.215–223, 2013.

- CHU, J. et al. Comparative analyses of secreted proteins from the phytopathogenic fungus *Verticillium dahliae* in response to nitrogen starvation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1854, n.5, p.437-448, 2015.
- CORRADI, N.; BONFANTE, P. The Arbuscularmycorrhizal symbiosis: origin and evolution of a beneficial plant infection. **PLoS Pathogens**. v.8, p.8–10, 2012.
- CORREL, J.C., KLITTICH, C.J.R., LESLIE, J.F. Nitrate non-utilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compatibility test. **Phytopathology**. v.77, p.1640-1646, 1987.
- DAHMS, T.E.S.; KAMINSKYJ, S.G.W. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. **Micron**.v.39, p.349–361, 2008.
- DARAN-LAPUJADE P. et al. Role of transcriptional regulation in controlling fluxes in central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. A chemostat culture study. **Journal of Biological Chemistry**. v.279, p.9125–9138, 2004.
- DESJARDINS, A.E.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. **Microbiological Reviews**. v.57, p.595–604, 1993.
- DIAGNE-LEYE, G. et al. The life cycle of the smut fungus *Moesziomyces penicillariae* is adapted to the short-cycle of the host, *Pennisetum glaucum*. **Fungal Biology**. v.117, p.311–318, 2013.
- DIVON, H.H. et al. The global nitrogen regulator, FNR1, regulates fungal nutrition-genes and fitness during *Fusarium oxysporum* pathogenesis. **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.485–497, 2006.
- DONOFRIO, N.M. et al. Global gene expression during nitrogen starvation in the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. **Fungal Genetics and Biology**. v.43, p.605–617, 2006.
- DRORI, N. et al. External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of PectateLyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.6, p.3258–326, 2003.
- FELENBOK, B. The ethanol utilization regulon of *Aspergillus nidulans*: the alcA–alcR system as a tool for the expression of recombinant proteins. **Journal Biotechnology**. v.17, p.11–17, 1991.
- FERNÁNDEZ-ACERO, F.J. et al. 2-DE proteomic approach to the *Botrytis cinerea* secretome induced with different carbon sources and plant-based elicitors. **Proteomics**. v.10, p.2270–2280, 2010.
- FIELD, K.J. et al. Contrasting arbuscular mycorrhizal responses of vascular and non-vascular plants to a simulated Palaeozoic CO<sub>2</sub> decline. **Natures Communications**. v.3, p.835, 2012.
- FLIPPPI, M.; KOCIALKOWSKA, J.; FELENBOK, B. Relationships between the ethanol utilization (alc) pathway and unrelated catabolic pathways in *Aspergillus nidulans*. **European Journal Biochemistry**.v.270, p.3555–3564,2003.

- FOSTER, A.J.; JENKINSON, J.M.; TALBOT, N.J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea*. **Embo Journal**.v.22, p.225–235,2003.
- GARDINER, D.M.; KAZAN, K.; MANNERS, J.M. Cross-kingdom gene transfer facilitates the evolution of virulence in fungal pathogens. **Plant Science**. v.210, p.151–158, 2013.
- GIRALDO, M.C.; VALENT, B. Filamentous plant pathogen effectors in action. **Nature Reviews Microbiology**. v.11, p.800–814,2013.
- GLASS, N.L.; DONALDSON, G.C. Development of primers sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous Ascomycetes. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n.4, p. 1323-1330, 1995
- GODOY, C.V. et al. Diagrammatic scales for bean diseases: development and validation. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz**. v.104, n.4, p.336-345, 1997.
- GUIDI, F. et al. Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**.v.1804, p.1516–1525, 2010.
- GURVITZ, A. et al. *Saccharomyces cerevisiae* Adr1p governs fatty acid beta-oxidation and peroxisome proliferation by regulating POX1 and PEX11. **Journal Biological Chemistry**. v.276, p.31825–31830, 2001.
- HAYWARD, R.D.; GOGUEN, J.D.; LEONG, J.M. No better time to FRET: shedding light on host pathogen interactions. **Journal of Biology**. v.9, p.12–16, 2010.
- HINNEBUSCH, A.G. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**. v.52, p.248–273, 1988.
- HOFF, B.; KÜCK, U. Use of bimolecular fluorescence complementation to demonstrate transcription factor interaction in nuclei of living cells from the filamentous fungus *Acremonium chrysogenum*. **Current Genetics**.v.47, p.132–138, 2005.
- HORBACH, R. et al. When and how to kill a plant cell: infection strategies of plant pathogenic fungi. **Journal of Plant Physiology**. v.168, p.51–62, 2011.
- HOROWITZ, S. et al. A defect in nir1, a nirA-like transcription factor, confers morphological abnormalities and loss of pathogenicity in *Colletotrichum acutatum*. **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.341–354, 2006.
- HOWARD, R.J. Cytology of fungal pathogens and plant–host interactions. **Current Opinion in Microbiology**. v.4, p.365–373, 2001.
- HUMPHREYS, C.P. et al. Mutualistic mycorrhizalike symbiosis in the most ancient group of land plants. **Nature Communications**. v.1, p.103, 2010.
- ISHIKAWA-ANKERHOLD, H.C.; ANKERHOLD, R.; DRUMMEN, G.P.C. Advanced fluorescence microscopy techniques - FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. **Molecules**.v.17, p.4047–4132, 2012.

- JACKSON, M.A.; BOTHAST, R.J. Carbon concentration and carbo-to-nitrogen ratio influence submerged-culture conidiation by the potential bioherbicide *Colletotrichum truncatum* NRRL13737. **Applied and Environmental Microbiology**. v.56, n.11, p.3435-3438, 1990.
- 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, n.3, 2013.
- JUN, H.; GUANGYE, H.; DAIWEN, C. Comparative proteome analysis of *Trichoderma reesei* grown on different carbon sources. **Journal of Proteomics**. v.89, p.191-201, 2013.
- JONES, J.D.; DANGL, J.L. The plant immune system. **Nature**. v.444, p.323–329, 2006.
- JUHASZ, T. et al. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. **Process Biochemistry**. v.40, p.3519–3525, 2005.
- KABBAGE, M.; YARDEN, O.; DICKMAN, M.B. Pathogenic attributes of *Sclerotinia sclerotiorum*: switching from a biotrophic to necrotrophic lifestyle. **Plant Science**. v.233, p.53–60, 2015.
- KAMTHAN, M. et al. Quantitative proteomics and metabolomics approaches to demonstrate N-acetyl-D-glucosamine inducible amino acid deprivation response as morphological switch in *Candida albicans*. **Fungal Genetics Biology**.v.49, p.369–378, 2012.
- KEMEN, E.; JONES, J.D. Obligate biotroph parasitism: can we link genomes to lifestyles? **Trends in Plant Science**.v.17, p.448–457, 2012.
- KIM, Y. et al. Autophagy induced by rapamycin and carbon-starvation have distinct proteome profiles in *Aspergillus nidulans*. **Biotechnology and Bioengineering**. v.108, p.2705–2715, 2011.
- KLEEMANN, J. et al. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags. **Microbiology**. v.154, p.1204-1217, 2008.
- KLIONSKY, D.J.; CUERVO, A.M.; SEGLEN, P.O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. **Autophagy**. v.3, p.181–206, 2007.
- KOLKMAN, A. et al. Proteome analysis of yeast response to various nutrient limitations. **Molecular Systems Biology**. v.2, 2006.
- KROLL, K.; PÄHTZ, V.; KNIEMEYER, O. Elucidating the fungal stress response by proteomics. **Journal of Proteomics**. v.97, p.151-163, 2014.
- LÓPEZ-BERGES, M.S. et al. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. **The Plant Cell**. v.22, p.2459–2475, 2010.
- LU, X. et al. The intra- and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. **Microbial Cell Factories**. v.20, p.9-23, 2010.

- LU, Z. et al. *In vivo* study of *Trichoderma* pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. **Applied and Environmental Microbiology**. v.70, p.3073–3081, 2004.
- MAJEAU, J.A.; BRAR, S.K.; TYAGI, R.D. Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants. **Bioresource Technology**. v.101, p.2331–2350, 2010.
- MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.17-32, 1997.
- MCCOTTER, S.W.; HORIANOPOULUS, L.C.; KRONSTAD, J.W. Regulation of the fungal secretome. **Current Genetics**.v.62, p.533–545,2016.
- MEDINA, M.L. et al. Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. **Proteomics**. v.5, p.3153–3161, 2005.
- MIYARA, I. et al. Multi-factor regulation of pectatelyase secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on avocado fruits. **Molecular Plant Pathology**. v.9, n.3, p.281–291, 2008.
- MONTANINI, B. et al. Gene expression profiling of the nitrogen starvation stress response in the mycorrhizal ascomycete *Tuber borchii*. **Fungal Genetics and Biology**. v.43, p.630–641, 2006.
- MUELLER, O. et al. The secretome of the maize pathogen *Ustilago maydis*. **Fungal Genetics and Biology**. v.45, 2008.
- NOGAWA, M. et al. L-Sorbose induces cellulase gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei*. **Current Genetics**. v.38, p.329–334, 2001.
- NOIREUNG, P. et al. Novel species of *Colletotrichum* revealed by morphology and molecular analysis. **Mycologie**. v.33, n.3, p.347-362, 2012.
- PAPER, J. et al. Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Proteomics**.v.7, p.3171–3183, 2007.
- PATEL, H.; GUPTE, A. Optimization of different culture conditions for enhanced laccase production and its purification from *Tricholoma giganteum*AGHP. **Bioresources and Bioprocessing**. v.3, p.11,2016.
- PATEL, H.; GUPTE, A.; GUPTE, S. Effect of different culture conditions and inducers on production of laccase by a basidiomycete fungal isolate *Pleurotusostreatus*HP-1 under solid state fermentation. **BioResources**. v.4, p.268–284, 2009.
- PAGEAU, K. et al. The two senescence-related markers, GS1 (cytosolic glutamine synthetase) and GDH (glutamate dehydrogenase), involved in nitrogen mobilization, are differentially regulated during pathogen attack and by stress hormones and reactive oxygen species in *Nicotianatabacum* L. leaves. **Journalof Experimental Botany**. v.57, p.547–557, 2006.
- PEREIRA, J.F. et al. Nitrato redutase em fungos filamentosos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.31, p.74-85, 2003.

- PERFECT, S.E.; GREEN, J.R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**. v.2, p.101–108, 2001.
- PELLIER, A.L. et al. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. **Molecular Microbiology**. v.48, p.639–655, 2003.
- PHALIP, V. et al. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. **Current Genetics**. v.48, p.366–379, 2005.
- PIETERSE, C.M.J. et al. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. **Nature Chemical Biology**. v.5, p.308–316, 2009.
- PROCTOR, R.H.; HOHN, T.M.; MCCORMICK, S.P. Reduced virulence of Gibberellae caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.8, p.593–601, 1995.
- RAMPITSCH, C. et al. The phosphoproteome of *Fusarium graminearum* at the onset of nitrogen starvation. **Proteomics**. v.10, p.124–140, 2010.
- RAVIKUMAR, G. et al. Production, purification and partial characterization of laccase from the mushroom *Hypsizygus ulmarius*. **International Journal of Pharma and Bio Science**. v.3, p.355–365, 2012.
- REDECKER, D.; KODNER, R.; GRAHAM, L.E. Glomalean fungi from the Ordovician. **Science**. v.289, p.1920–1921, 2000.
- REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. **Mycological Research**. v.106, n.12, p.1427–1434, 2002.
- REN, M. et al. Alteration of the protein kinase binding domain enhances function of the *Saccharomyces cerevisiae* molecular chaperone Cdc37. **Eukaryotic Cell**. v.6, p.1363–1372, 2007.
- SALOHEIMO, M. et al. cDNA cloning of a *Trichoderma reesei* cellulase and demonstration of endoglucanase activity by expression in yeast. **European Journal of Biochemistry**. v.249, p.584–595, 1997.
- SHARMA, K. Bionatural management of pests in organic farming. **Agrobios Newsletter**. v.2, p.296–325, 2004.
- SKAMNIOTI, P. et al. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.20, p.568–580, 2007.
- SNOEIJERS, S. et al. The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. **European Journal of Plant Pathology**. v.106, p.493–506, 2000.
- SOANES, D.M. et al. Regulation of the MPG1 hydrophobin gene in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.15, p.1253–1267, 2002.

SOLOMON, P.S.; TAN, K.C.; OLIVER, R.P. The nutrient supply of pathogenic fungi; a fertile field for study. **Molecular Plant Pathology**. v.4, p.203–210, 2003.

STASKAWICZ, B.J. Genetics of plant–pathogen interactions specifying plant disease resistance. **Plant Physiology**. v.125, p.73–76, 2001.

STEPHAN, J.S. et al. The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. **Proceedings of the National Academy of Science USA**. v.106, p.17049–17054, 2009.

STEPHENSON, S.A. et al. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.13, p.929–941, 2000.

STRICKER, A.R.; MACH, R.L.; de GRAAFF, L.H. Regulation of transcription of cellulase- and hemicellulase-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*). **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.78, p.211–220, 2008.

STROBEL, G.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.67, p.491–502, 2003.

TALBOT, N.J. et al. Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.50, p.179–195, 1997.

TANABE, S. et al. The role of catalase–peroxidase secreted by *Magnaporthe oryzae* during early infection of rice cells. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.24, p.163–171, 2011.

TAVERNIER, V. et al. The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. **Journal of Experimental Botany**. v.58, p.3351–3360, 2007.

THINES, E.; WEBER, R.W.; TALBOT, N.J. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. **Plant Cell**. v.12, p.1703–1718, 2000.

THOMMA, B.P. et al. Nitrogen controls *in planta* expression of *Cladosporium fulvum* Avr9 but no other effector genes. **Molecular Plant Pathology**. v.7, p.125–130, 2006.

THURSTON, C.R. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**. v.140, p.19–26, 1994.

TRIPATHI, G. et al. Gcn4 co-ordinates morphogenetic and metabolic responses to amino acid starvation in *Candida albicans*. **EMBO Journal**. v.21, p.5448–5456, 2002.

TYLER, B.M. et al. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. **Science**. v.313, p.1261–1266, 2006.

VLEESHOUWERS, V.G.; OLIVER, R.P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.27, p.196–206, 2014.

WALTERS, D.R.; BINGHAM, I.J. Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. **Annals of Applied Biology**. v.151, p. 307–324, 2007.

WANG, X. et al. The role of effectors and host immunity in plant–necrotrophic fungal interactions. **Virulence**. v.5, p.722–32, 2014.

WANG, Y. et al. Comparative secretome investigation of *Magnaporthe oryzae* proteins responsive to nitrogen starvation. **Journal of Proteome Research**. v.10, p.3136–3148, 2011.

WU, J. et al. Global analysis of nutrient control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during growth and starvation. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**. v.101, p.3148–3153, 2004

YAKOBY, N.; et al. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. v.14, p.988–995, 2001.

YANG, F. et al. Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. **Molecular Plant Pathology**. v.13, p.445–453, 2012.

YI, M.; VALENT, B. Communication between filamentous pathogens and plants at the biotrophic interface. **Annual Review of Phytopathology**. v.51, p.567–611, 2013.

YIN, Z. et al. Proteomic response to amino acid starvation in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. **Proteomics**. v.4, p.2425–2436, 2004.

ZAMIOUDIS, C.; PIETERSE, C.M. Modulation of host immunity by beneficial microbes. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. v.25, p.139–150, 2012.

ZEILINGER, S.; et al. Friends or foes? Emerging insights from fungal interactions with plants. **FEMS Microbiology Reviews**. v.40, n.2, p.182-207, 2015.

#### **4. Reação dos tecidos foliares de *Solanum lycopersicum* e *Phaseolus lunatus* ao secretoma de muntantes nit de *Colletotrichum* spp. produzidos em estresse nutricional.**

##### **RESUMO**

A atuação de elementos transponíveis como geradores de instabilidade e variabilidade genética tem sido investigada em fitopatógenos com altos níveis de variabilidade como é o caso de *Colletotrichum* spp. Essa instabilidade pode causar a inativação espontânea de genes que codificam o catabolismo de nitrato, especialmente a enzima nitrato redutase, com implicações sobre a patogênese. O objetivo do presente estudo é verificar se mutantes Nit de *Colletotrichum* spp. alteram a atividade de substâncias extracelulares ativas contra tecidos foliares de *Solanum lycopersicum* (*Sl*) e *Phaseolus lunatus* (*Pl*). Os mutantes resistentes a clorato foram obtidos mediante germinação de esporos em meio mínimo acrescido de batata (100g/L) e clorato de potássio (150mM). As colônias dos Tipos selvagem e seus mutantes foram submetidos a estresse nutricional em meio mínimo líquido acrescido de fontes combinadas de carbono 10g/L (sacarose e sorbitol) e nitrogênio 1g/L (nitrato de potássio e extrato de levedura). As massas seca e fresca, variação de massa, esporulação, variação de pH e lesões teciduais provocadas pela infiltração do secretoma nas folhas de *Sl* e *Pl*. Os resultados de produção de biomassa, esporulação e variação de pH mostram que a fonte de carbono sacarose e a de nitrogênio nitrato de potássio ocasionaram estresse nutricional nos isolados, especialmente aos mutantes Nit devido a deficiência em metabolizar o nitrato. As lesões teciduais foram mais diversas para a fonte de carbono sacarose e para a de nitrogênio extrato de levedura. Os mutantes Nit na presença de extrato de levedura exibiram maior capacidade lesiva que os Tipos selvagens, tanto em tecidos de hospedeiros quanto em não-hospedeiros. A habilidade de utilizar fontes de nitrogênio alternativas ao nitrato parece contribuir para o sucesso da patogênese, incluso com a inespecificidade entre patógeno e hospedeiro.

**Palavras-chave:** clorato, nitrato, variabilidade, inespecificidade.

### ABSTRACT

The performance of transposable elements as generators of instability and genetic variability has been investigated in phytopathogens with high levels of variability such as *Colletotrichum* spp. This instability may cause spontaneous inactivation of genes encoding nitrate catabolism, especially the nitrate reductase enzyme, with implications for pathogenesis. The objective of the present study is to verify if Nit mutants of *Colletotrichum* spp. alter the activity of active extracellular substances against leaf tissues of *Solanum lycopersicum* (S1) and *Phaseolus lunatus* (P1). Chlorate resistant mutants were obtained by germination of spores in minimal medium supplemented with potato (100g / L) and potassium chlorate (150mM). The colonies of wild types and their mutants were submitted to nutritional stress in liquid medium supplemented with combined sources of carbon 10g / L (sucrose and sorbitol) and nitrogen 1g / L (potassium nitrate and yeast extract). The dry and fresh masses, mass variation, sporulation, pH variation and tissue damage caused by the infiltration of the secretoma in the leaves of S1 and P1. The results of biomass production, sporulation and pH variation show that the sucrose carbon source and of nitrogen potassium nitrate caused nutritional stress in the isolates, especially Nit mutants due to deficiency in nitrate metabolism. The tissue lesions were more diverse for the carbon source sucrose and for the nitrogen of yeast extract. Nit mutants in the presence of yeast extract exhibited greater deleterious capacity than wild types in both host and non-host tissues. The ability to utilize nitrogen sources that are alternative to nitrate seems to contribute to the success of the pathogenesis, including the pathogen and host non-specificity.

**Keywords:** chlorate, nitrate, variability, non-specificity.

#### 4.1. Introdução

Os mutantes Nit são empregados em estudos de instabilidade e estrutura genética, dinâmica de populações e para avaliar as reações de compatibilidade entre linhagens em várias espécies de fungo (LESLIE, 1993). Estudos de compatibilidade vegetativa com mutantes Nit foram feitos para várias espécies de *Colletotrichum* (ABANG et al., 2004; BEYNON et al., 1995; FURGAL-WEGRZYKA, 1997;). Mutantes enzimáticos deficientes em uma via de aquisição de nutrientes, como a do nitrato, podem contribuir para o melhor entendimento da interação bioquímica entre patógeno e hospedeiro.

A instabilidade de genética de *Colletotrichum* spp. é notada pela frequente emissão espontânea de setores, assim como acontece em outros fitopatógenos tais como *Fusarium* spp. cujas colônias podem produzir setores que diferem na morfologia, virulência e em outras características da colônia parental (KLITTICH E LESLIE, 1988). Vários mecanismos explicam a alta variabilidade patogênica e a instabilidade genética de *Colletotrichum* spp. Estes incluem heterocariose, aneuploidia, recombinação, mutações causadas por elementos transponíveis e ciclo parasexual com parameiose (CASELA; FREDERIKSEN, 1994; SOUZA-PACCOLA et al., 2003). O envolvimento de elementos transponíveis como geradores de instabilidade e variabilidade genética tem sido investigada em fitopatógenos com altos níveis de variabilidade (DABOUSSI E CAPY, 2003) como é o caso de *Colletotrichum* spp.

Uma das estratégias usadas para identificar elementos transponíveis em fungos patogênicos é baseada na inativação espontânea de genes que codificam o catabolismo de nitrato, especialmente a enzima nitrato redutase (AMUTAN et al., 1996; DABOUSSI, 1996; MAURER et al., 1997). Devido ao caráter espontâneo de isolados fúngicos mutantes para esses genes são facilmente obtidos por seleção positiva via resistência ao clorato. O clorato é transportado para o meio intracelular por uma permease e é reduzido a clorito pela ação da nitrato redutase da mesma forma que o nitrato. O clorito é tóxico à célula fúngica promovendo a sua morte, estudos demonstram que o clorito gera um estresse oxidativo e danifica importantes biomoléculas na célula. (INGRAM et al., 2003). Portanto células que apresentam um complexo nitrato redutase funcional morrem e aquelas que dispõem de uma cópia do complexo não-funcional sobrevivem a interação com clorato.

As colônias que crescem em meio de cultura contendo clorato são resistentes a clorato porém não necessariamente são mutantes para a enzima nitrato redutase. Mutações em cinco genes podem exibir o fenótipo de resistência a clorato: (i) mutação para permease de nitrato, (ii) mutação no gene do regulador específico de assimilação do nitrato, (iii) mutação no gene do regulador geral de assimilação do nitrato, (iv) mutações em genes envolvidos com o cofator

molibdênio e (v) mutações no gene da nitrato redutase. (COVE, 1979). Essas mutações correlacionam-se com o crescimento ou não em meio mínimo contendo separadamente as fontes de nitrogênio: nitrato, nitrito, hipoxantina, glutamato e amônio.

Os mutantes obtidos são chamados de mutantes Nit e geralmente contem alterações na estrutura do loci ou nos reguladores do metabolismo de nitrato ou rotas metabólicas relacionadas. Por serem resistentes ao clorato os mutantes Nit podem ser obtidos a partir de setores de crescimento rápido em meio de cultivo contendo clorato (CRAWFORD; ARST, 1993). Nesse meio o crescimento das linhagens selvagens é restrito pois elas reduzem clorato a clorito tóxico pela atividade da nitrato redutase. Os mutantes Nit não reduzem clorato a clorito tóxico, logo são resistentes ao clorato e não sofrem restrições no crescimento (COVE, 1976a, b). Os mutantes Nit também tem sido empregados em estudos de instabilidade e estrutura genética, dinâmica de populações e para avaliar as reações de compatibilidade entre linhagens em várias espécies de fungo (LESLIE, 1993). Estudos de compatibilidade vegetativa com mutantes Nit foram feitos para várias espécies de *Colletotrichum* (ABANG et al., 2004; BEYNON et al., 1995; FURGAL-WEGRZYKA, 1997;).

Mutantes enzimáticos deficientes em uma via de aquisição de nitrogênio podem contribuir para o melhor entendimento do efeito da falta de nitrogênio na interação bioquímica entre patógeno e hospedeiro. A alteração no metabolismo de nitrogênio pode afetar a habilidade dos fitopatógenos em modular seu secretoma (KIM et al, 2013; MEINHARDT et al., 2014) que facilita a aquisição de nutrientes e sobrepõe a resposta imune da planta. (McCOTTER et al., 2016). Estudos moleculares utilizando mutantes enzimáticos demonstram que proteínas extracelulares possuem um papel na patogênese (REDMAN; RODRIGUEZ, 2002). O objetivo do presente estudo é verificar se isolados de *Colletotrichum* spp. resistentes a clorato alteram o efeito de substâncias extracelulares ativas contra tecidos foliares de *S. lycopersicum* e *P. lunatus* em relação aos Tipos selvagens.

## 4.2. Metodologia

Os mutantes de *Colletotrichum* spp. resistentes a clorato foram obtidos com o cultivo dos Tipos selvagens em meio de cultura constituído por batata (100g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5g),  $\text{KCl}$  (0,5g),  $\text{MgSO}_4$  (0,5g),  $\text{FeSO}_4$  (0,01g),  $\text{ZnSO}_4$  (0,01g), dextrose (10g), agar (15g) em 1L de água destilada, aos quais foram adicionados 150mM de clorato de potássio. O volume de 100 $\mu\text{L}$  de uma suspensão de esporos contendo  $10^5$  esporos $\cdot\text{mL}^{-1}$  foi depositado e espalhado sobre esse meio. As placas com meio de cultivo inoculado foram mantidas em BOD no escuro a 25°C durante 15 dias. As colônias formadas foram repicadas e submetidas a confirmação de mutagênese.

O meio de cultivo usado para confirmar a mutagênese continha  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1,5g),  $\text{KCl}$  (0,5g),  $\text{MgSO}_4$  (0,5g),  $\text{FeSO}_4$  (0,01g),  $\text{ZnSO}_4$  (0,01g), dextrose (10g), agar (15g) em 1L de água destilada, aos quais foram adicionados 150mM de clorato de potássio. As colônias que cresceram nessa condição foram preservadas e usadas como inóculo nos experimentos de estresse nutricional.

### 4.2.1. Estresse nutricional

O meio líquido base foi constituído de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1g);  $\text{ZnSO}_4$  ( $4,4 \cdot 10^{-4}$  g);  $\text{FeCl}_3$  ( $4,8 \cdot 10^{-4}$ g);  $\text{MnCl}_2$  ( $3,6 \cdot 10^{-4}$ g);  $\text{MgSO}_4$  (0,1g) e de solução traço (0,01mL). A solução traço continha ácido cítrico (50g);  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  (10g);  $\text{CuSO}_4$  (2,5g);  $\text{MnSO}_4$  (5g);  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (0,5g);  $\text{NaMoO}_4$  (0,5g), ao meio base foram adicionadas, separadamente, duas fontes de carbono e duas de nitrogênio. A fonte de carbono sacarose (10g/L) foi combinada separadamente às fontes de nitrogênio: nitrato de potássio e extrato de levedura, ambas na concentração de 1g/L. A mesma proporção foi aplicada na associação da fonte de carbono sorbitol com as de nitrogênio nitrato de potássio e extrato de levedura. Foram inoculados três discos (10mm) de meio de cultivo contendo micélio em 30mL de meio de cultivo líquido contido em tubos tipo Falcon de 50mL de capacidades. Os isolados cresceram em meio líquido durante 21 dias. No sétimo e no décimo quarto dia de crescimento os cultivos foram submetidos a aeração, processo conduzido em câmara de fluxo laminar onde os tubos foram ventilados para renovação do ar em seu interior.

### 4.2.2. Condições de crescimento e variáveis analisadas

A produção de massa fresca, seca e sua variação, a variação de pH entre tratamentos e controles e a produção de esporos foram avaliadas. A fase líquida (secretoma) foi separada do crescimento micelial mediante filtração em tecido tipo gaze. O crescimento micelial foi determinado pela massa fresca, a massa seca após 24h de secagem a 30°C e a variação de massa

dada pela diferença entre massa fresca e seca. O pH do secretoma foi medido com o auxílio do pHmetro (Quimis Q400AS), a variação de pH foi calculada pela diferença entre o pH das testemunhas não inoculadas e o pH dos respectivos tratamentos inoculados. Os esporos foram separados do secretoma por centrifugação de 1 minuto a 1000 rpm. Aproximadamente 200µL do secretoma livre de esporos foi infiltrado na nervura central de folhas de *Sl* e *Pl*. Cada tratamento foi infiltrado em três plantas de cada espécie, em cada planta nove folíolos foram infiltrados. Os folíolos foram observadas durante sete dias e o tipo de lesão foi registrado.

#### 4.2.3. Delineamento experimental e análise estatística

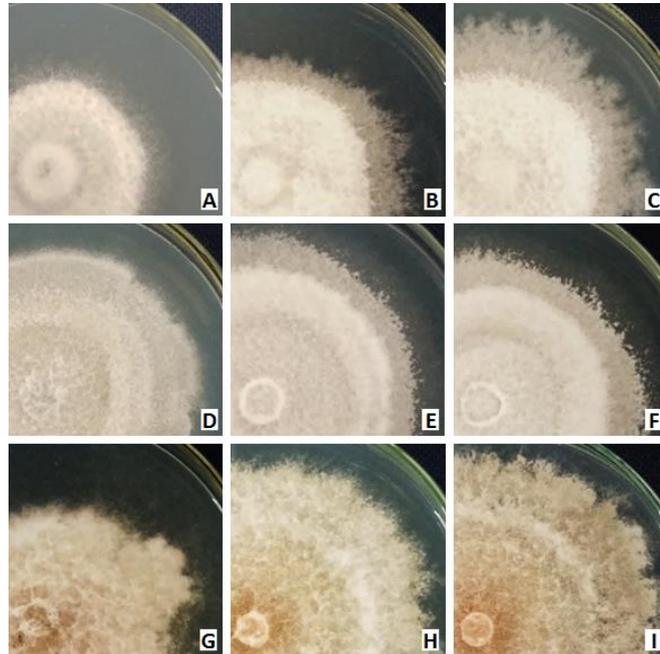
O experimento contou com 40 tratamentos (Carbono x Nitrogênio x Isolados + Testemunhas) com três repetições perfazendo 120 parcelas em delineamento inteiramente casualizado. Os tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey no nível de 5% de probabilidade, cada experimento e variável foi analisado individualmente. Nas análise de variância que resultaram em coeficientes de variação acima de 30%, para otimizar a resolução do teste de médias os dados de esporulação e variação de massa foram transformados por SQDR (Y+1) e a variação de pH foi transformada por SQDR (YGauss+1).

### 4.3. Resultados

#### 4.3.1. Obtenção de mutantes Nit.

No total foram isolados 22 colônias resistentes a clorato para cada espécie de *Colletotrichum*. O crescimento da colônias selvagens e resistentes a clorato em meio contendo batata 10g/L e clorato de potássio (KClO<sub>3</sub>) 150mM durante 30 dias (Figura 13) revelou colônias de *Colletotrichum siamense* com micélio branco leitoso e presença de micélio aéreo. Os mutantes CsM1 e CsM2 apresentaram coloração e textura semelhantes ao Tipo selvagem. *Colletotrichum truncatum* exibiu colônias de micélio branco leitoso com presença de micélio aéreo compactado. Os mutantes CtM1 e CtM2 apresentaram coloração e textura semelhantes ao Tipo selvagem. As colônias de *Colletotrichum musae* exibiram coloração bege com uma zona alaranjada ao centro e micélio aéreo de coloração branca. Os mutantes CmM1 e CmM2 tiveram características morfoculturais semelhantes ao Tipo selvagem.

Figura 13 - Crescimento micelial de isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* em  $\text{KClO}_3$  150mM e batata 10/L aos 30dai. A – Cs, B – CsM1, C – CsM2, D – Ct, E – CtM1, F – CtM2, G – Cm, H – CmM1, I – CmM2.



Aleatoriamente, dois mutantes foram selecionadas e repicadas para meio contendo meio mínimo e 150 mM de clorato de potássio ( $\text{KClO}_3$ ) como única fonte de nitrogênio. O diâmetro médio das colônias (Tabela 24) de *Colletotrichum siamense* foi de 14 mm, enquanto que os seus mutantes CsM1 e CsM2 apresentaram médias de 82 e 70 mm. Os três isolados diferiram significativamente do controle e entre si. *Colletotrichum truncatum* não cresceu nem diferiu significativamente do controle nessa condição e seus mutantes CtM1 e CtM2 exibiram diâmetros médios de 49 e 46 mm respectivamente diferindo significativamente do seu Tipo selvagem. *Colletotrichum musae* não cresceu na presença de clorato de potássio como única fonte de nitrogênio e seus mutantes CmM1 e CmM2 obtiveram diâmetros médios de 32 e 35 mm respectivamente, diferindo significativamente do controle e do seu Tipo selvagem.

Tabela 24 – Diâmetro médio das colônias de isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* em KClO<sub>3</sub> 150mM aos sete dias de cultivo.

Isolado	Código	Diâmetro (mm)
<i>Colletotrichum siamense</i>	Cs	14 B
<i>C. siamense</i> Mutante 1	CsM1	82 F
<i>C. siamense</i> Mutante 2	CsM2	70 E
<i>Colletotrichum truncatum</i>	Ct	0 A
<i>C. truncatum</i> Mutante 1	CtM1	49 D
<i>C. truncatum</i> Mutante 2	CtM2	46 D
<i>Colletotrichum musae</i>	Cm	0 A
<i>C. musae</i> Mutante 1	CmM1	32 C
<i>C. musae</i> Mutante 2	CmM2	35 C
Controles	Ctrl	0 A

C.V.%=8,12

Médias seguidas letra distintas diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05).

#### 4.3.2. Estresse nutricional

O acúmulo de massa fresca variou de 1,02 a 4,80 gramas (Tabela 25), o isolado Cm produziu a maior quantidade de massa fresca no tratamento sacarose nitrato de potássio. As fontes de nitrogênio influenciaram o crescimento micelial. A fonte de nitrogênio Extrato de levedura proporcionou as maiores médias de massa fresca enquanto que nitrato de potássio ocasionou as menores médias.

O isolado Cs cresceu de 1,34 a 2,73 gramas, esses extremos foram registrados na presença de sorbitol associado às fontes de nitrogênio nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente. O tratamento sorbitol nitrato de potássio diferiu significativamente dos demais tratamentos. O mutante CsM1 produziu de 1,02 a 3,67 gramas de massa fresca, esses extremos foram registrados na presença de sacarose associada às fontes nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente. As menores quantidades de massa fresca foram registradas nos tratamentos com nitrato de potássio que diferiram significativamente daqueles com extrato de levedura. CsM2 produziu de 1,30 a 3,76 gramas de massa fresca, esses extremos foram registrados na presença de sorbitol associado às fontes de nitrogênio nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente.

Tabela 25 – Produção de massa fresca (g) por isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* aos 21 dias de cultivo.

	Sacarose		Sorbitol	
	Nitrato de potássio	Extrato de levedura	Nitrato de potássio	Extrato de levedura
Cs	2,34 Bb	2,68 ABb	1,34 Aa	2,73 ABb
CsM1	1,02 Aa	3,67 BCDB	1,82 Aa	3,19 Bb
CsM2	2,39 ABab	2,29 ABCbc	1,30 Aa	3,76 Bc
Ct	3,98 Cb	3,91 BCDab	2,45 ABa	2,99 Bab
CtM1	1,71 ABa	2,34 ABab	2,08 ABab	2,86 ABb
CtM2	1,94 ABa	1,92 Aa	1,64 Aa	3,63 Bb
Cm	4,80 Cb	4,45 Db	3,06 Ba	2,85 Ba
CmM1	2,00 ABa	3,84 CDb	2,62 ABa	2,93 ABab
CmM2	2,50 ABa	4,09 Db	2,23 ABa	2,87 ABa
Controles	1,57 ABa	1,64 Aa	1,99 ABa	1,77 Aa
				C.V.%=19,42

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

*Colletotrichum truncatum* produziu de 2,45 a 3,98 gramas de massa fresca, as menores quantidades foram registrada nos tratamentos com sorbitol. O mutante CtM1 produziu de 1,71 a 2,86 gramas de massa fresca, as menores quantidades foram obtidas nos tratamentos com nitrato de potássio. O isolado CtM2 produziu de 1,64 a 3,63 gramas de massa fresca, esses extremos foram observados nos tratamentos com sorbitol associado a nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente.

O isolado *Cm* produziu de 2,85 a 4,80 gramas de massa fresca. A fonte de carbono que sustentou a produção das menores quantidades de massa fresca foi o sorbitol e a fonte de nitrogênio foi o extrato de levedura. O mutante CmM1 produziu de 2 a 3,84 gramas de massa fresca, esses extremos foram observados nos tratamentos com sacarose associada a nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente. O isolado CmM2 produziu de 2,23 a 4,09 gramas de massa fresca, as menores quantidades foram registradas nos tratamentos com sorbitol e com nitrato de potássio.

A produção de massa seca variou de 0,81 a 1,43 gramas (Tabela 26), o isolado CmM2 no tratamento sorbitol extrato de levedura produziu a maior quantidade de massa seca. De modo geral o tratamento sacarose nitrato de potássio exibiu as menores médias de massa seca, enquanto que o tratamento sorbitol extrato de levedura exibiu as maiores. Os demais tratamentos não diferiram significativamente entre si.

Tabela 26 - Produção de massa seca (g) por isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* aos 21 dias de cultivo.

	Sacarose		Sorbitol	
	Nitrato de potássio	Extrato de levedura	Nitrato de potássio	Extrato de levedura
<i>Cs</i>	0,84 Aa	0,87 ABCa	0,89 ABa	1,08 BCb
<i>CsM1</i>	0,82 Aa	0,89 ABCa	0,88 ABa	1,14 Cb
<i>CsM2</i>	0,82 Aa	0,90 ABCa	0,81 Aa	1,43 Db
<i>Ct</i>	0,88 Aa	0,89 ABCa	0,85 ABa	1,04 ABCb
<i>CtM1</i>	0,88 Aa	0,89 ABCa	0,85 ABa	1,10 Cb
<i>CtM2</i>	0,87 Aa	0,81 Aa	0,87 ABa	1,01 ABCb
<i>Cm</i>	0,92 Aab	0,81 Aa	0,97 Bb	0,96 ABb
<i>CmM1</i>	0,87 Aa	0,95 BCa	0,98 Ba	0,95 ABa
<i>CmM2</i>	0,86 Aa	1,00 Cb	0,92 ABab	0,92 Aab
Controles	0,80 Aa	0,84 ABab	0,95 ABb	0,94 Ab
				C.V.%=5,93

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ).

O isolado *Cs* produziu de 0,84 a 1,08 gramas de massa seca em sacarose nitrato de potássio e sorbitol extrato de levedura respectivamente. O tratamento sorbitol extrato de levedura diferiu significativamente dos demais tratamentos. O mutante *CsM1* produziu de 0,82 a 1,14 gramas, novamente as menores quantidades foram registradas em sacarose nitrato de potássio e as maiores no tratamento sorbitol extrato de levedura que diferiu significativamente dos demais tratamentos. O isolado *CsM2* produziu de 0,81 a 1,43 gramas de massa seca, esses extremos foram registrados na presença de sorbitol associado às fontes de nitrogênio nitrato de

potássio e extrato de levedura respectivamente. O tratamento sorbitol extrato de levedura diferiu significativamente dos demais.

*Colletotrichum truncatum* produziu de 0,85 a 1,04 gramas de massa seca, seu mutante CtM1 produziu de 0,85 a 1,10 gramas, em ambos, esses extremos foram registrados nos tratamentos sorbitol nitrato de potássio e sorbitol extrato de levedura respectivamente. O tratamento sorbitol extrato de levedura diferiu dos demais. O isolado CtM2 produziu de 0,81 a 1,01 gramas de massa seca, as menores quantidades de massa seca foram registradas no tratamento sacarose extrato de levedura e as maiores no tratamento sorbitol extrato de levedura.

*Colletotrichum musae* produziu de 0,81 a 0,97 gramas de massa seca, as menores quantidades foram observadas em cultivos contendo sacarose e as maiores em cultivos com sorbitol. O mutante CmM1 produziu de 0,87 a 0,98 gramas de massa seca, contudo não houve diferença significativa entre os tratamentos. O isolado CmM2 produziu de 0,86 a 1 grama de massa seca, o maior acúmulo de massa foi registrado para o tratamento sacarose extrato de levedura que diferiu significativamente dos demais.

Os valores de variação de massa foram de 0,19 a 4,02 gramas (Tabela 27), o isolado *Cm* registrou a maior variação de massa no tratamento sacarose nitrato de potássio. De modo geral as fontes de nitrogênio influenciaram na variação da massa fresca. O extrato de levedura proporcionou as maiores variações de massa enquanto que nitrato de potássio ocasionou as menores variações.

O isolado *Cs* registrou variações de massa entre 0,45 e 1,81 gramas, os menores valores foram observados no meio de cultivo sorbitol nitrato de potássio e os maiores valores em sacarose extrato de levedura. O tratamento sorbitol nitrato de potássio diferiu significativamente dos demais tratamentos.

O mutante CsM1 produziu variações de 0,19 a 2,78 gramas, esses extremos foram observados na presença de sacarose associada a nitrato de potássio e a extrato de levedura respectivamente. As menores variações de massa foram registradas nos tratamentos com nitrato de potássio que diferiram significativamente daqueles com extrato de levedura.

A variação de massa do mutante CsM2 foi de 0,49 a 2,65 gramas, esses extremos foram registrados na presença de sorbitol associado às fontes de nitrogênio nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente.

*Colletotrichum truncatum* produziu variações de massa entre 1,6 e 3,10 gramas, as menores quantidades foram registradas nos tratamentos com sorbitol. As variações de massa observadas para o mutante CtM1 foram de 0,83 a 1,78 gramas, as menores quantidades foram observadas nos tratamentos com nitrato de potássio. A variação de massa do isolado CtM2 foi

de 0,82 a 2,70 gramas, esses extremos foram observados nos tratamentos com sorbitol associado a nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente.

O isolado *Cm* produziu variações de massa entre 1,96 a 4,02 gramas, a fonte de carbono sorbitol e a de nitrogênio extrato de levedura ocasionaram as menores variações de massa. A variação de massa do mutante *CmM1* foi de 1,07 a 2,79 gramas, esses extremos foram observados no tratamento sacarose nitrato de potássio e extrato de levedura respectivamente. O isolado *CmM2* produziu variações de massa entre 1,31 e 3,03 gramas, as menores quantidades foram registradas nos tratamentos com sorbitol e com nitrato de potássio.

Tabela 27 – Variação de massa (g) em isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* aos 21 dias de cultivo.

	Sacarose		Sorbitol	
	Nitrato de potássio	Extrato de levedura	Nitrato de potássio	Extrato de levedura
Cs	1,50 BCb	1,81 ABCDb	0,45 Aa	1,64 ABb
CsM1	0,19 Aa	2,78 BCDEFb	0,94 ABa	2,05 Bb
CsM2	1,56 Bbc	1,38 ABCab	0,49 ABa	2,65 Bc
Ct	3,10 CDc	3,02 CDEFab	1,60 BCa	1,98 Bab
CtM1	0,83 ABa	1,41 ABCab	1,26 ABCab	1,78 ABb
CtM2	1,07 Ba	1,12 ABa	0,82 ABa	2,70 Bb
Cm	4,02 Db	3,64 Fb	2,03 Ca	1,96 Ba
CmM1	1,07 ABa	2,79 DEFb	1,63 BCa	1,97 Bab
CmM2	1,59 Ba	3,03 EFb	1,31 ABCa	1,94 ABab
Controles	0,77 ABa	0,80 Aa	1,04 ABCa	0,83 Aa
				C.V.%=9,03

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (Y+1).

A produção de esporos variou de 0 a  $7,9 \times 10^5$  esporos/mL (Tabela 28). O *C. siamense* e seus mutantes Nit não esporularam. O *C. truncatum* esporulou somente no meio de cultivo sorbitol extrato de levedura, contudo sem diferenciar dos demais tratamentos. A esporulação de *Cm* variou de 0 a  $7,9 \times 10^5$  esporos/mL, a maior produção foi registrado no tratamento sorbitol

extrato de levedura que diferiu significativamente dos demais tratamentos. O mutantes CmM1 registrou esporulações entre 0,3 e 5,3 x10<sup>5</sup> esporos/mL e o mutante CmM2 registrou esporulações de 0,1 a 6,1 x10<sup>5</sup> esporos/mL, em ambos as maiores esporulações foram observadas nos tratamentos com extrato de levedura.

De modo geral as fontes de nitrogênio influenciaram a esporulação, nitrato de potássio ocasionou as menores taxas de esporulação, enquanto que extrato de levedura proporcionou as maiores.

Tabela 28 - Esporulação média 10<sup>5</sup> esporos/mL em isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* aos 21 dias de cultivo.

	Sacarose		Sorbitol	
	Nitrato de potássio	Extrato de levedura	Nitrato de potássio	Extrato de levedura
Cs	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
CsM1	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
CsM2	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
Ct	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0,1 Aa
CtM1	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
CtM2	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
Cm	0,3 Aa	0 Aa	0,2 Aa	7,9 Cb
CmM1	0,3 Aa	3,2 Bb	0,3 Aa	5,3 Bb
CmM2	0,1 Aa	2,2 Bb	0,8 Aa	6,1 BCc
Controles	0 Aa	0 Aa	0 Aa	0 Aa
C.V.%=18,28				

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0.05), SQDR (Y+1).

As combinação sacarose com fontes de nitrogênio os isolados exibiram variações de pH significativas (Tabela 29). O isolado Cs causou alcalinização, exceto no tratamento sacarose extrato de levedura no qual não houve variação de pH expressiva. Os mutantes CsM1 e CsM2 promoveram alcalinização somente no tratamento sorbitol extrato de levedura o qual diferiu significativamente dos demais.

O isolado *Ct* sofreu ocasionou acidificação nos tratamentos com sacarose e alcalinização naqueles com sorbitol. Os mutantes CtM1 e CtM2 registraram acidificação nos meios com nitrato de potássio e alcalinização nos tratamentos com extrato de levedura.

*Colletotrichum musae* ocasionou acidificação nos tratamentos com sacarose e alcalinização naqueles com sorbitol. Em função da distribuição anormal dos dados foi aplicado o estimador de densidade Kernel o qual apontou para uma ajuste com a distribuição gaussiana. Os valores estimados para o modelo foram então transformados em SQDR (YGauss+1)

Tabela 29 – Variação de pH do secretoma em isolados selvagens e mutantes de *Colletotrichum* aos 21 dias de cultivo.

	Sacarose		Sorbitol	
	Nitrato de potássio	Extrato de levedura	Nitrato de potássio	Extrato de levedura
Cs	0,66 Cb	-0,05 Ca	0,99 Cb	1,17 Bb
CsM1	-0,89 Aa	-1,03 ABab	-0,36 Ab	0,75 Bc
CsM2	-0,95 Aa	0,11 BCbc	-0,06 ABb	0,46 ABc
Ct	-0,27 BCb	-1,41 Aa	0,48 BCc	0,85 Bc
CtM1	-0,74 Aa	0,26 Cc	-0,26 Ab	0,82 Bd
CtM2	-0,90 Aa	0,24 Cc	-0,29 Ab	0,87 Bd
Cm	-0,75 Aa	-1,21 Aa	0,72 Cb	0,92 Bb
CmM1	-0,59 ABab	-1,25 Aa	-0,29 Ab	0,78 Bc
CmM2	-0,65 ABab	-1,32 Aa	-0,33 Ab	0,78 Bc
Controles	0 Ca	0 Ca	0 ABa	0 Aa
				C.V.%=4,32

Médias seguidas letra distintas, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ), SQDR (YGauss+1).

De modo geral as fontes de carbono interferiram na variação de pH, sacarose proporcionou os menores valores de variação implicando na acidificação do meio de cultivo. A fonte de carbono sorbitol registrou os maiores valores de variação de pH ocasionando a alcalinização do meio de cultivo, principalmente na associação com extrato de levedura, a qual diferiu significativamente da associação sorbitol nitrato de potássio.

#### 4.3.3. Lesões teciduais

A infiltração do secretoma obtido dos isolados selvagens e mutantes crescidos nos meios de cultivo sacarose nitrato de potássio (Figura 14 A-J), sacarose extrato de levedura (Figura 14 L-U), sorbitol nitrato de potássio (Figura 15 A-J) e sorbitol extrato de levedura (Figura 15 L-U) ocasionaram lesões no tecido foliar de *S. lycopersicum*.

Nos tratamentos com sacarose o isolado Cs ocasionou pequenas lesões necróticas restritas ao ponto de introdução da agulha durante a perfusão. O tratamento nitrato de potássio ocasionou lesões mais expressivas que extrato de levedura. O mutante CsM1 não ocasionou lesões na presença de nitrato de potássio, porém com extrato de levedura promoveu lesões necróticas amplas e de fundo claro. Na presença de nitrato de potássio CsM2 ocasionou leve escurecimento dos tecidos perfundidos, com extrato de levedura as lesões necróticas foram amplas e com murcha marginal do folíolo.

O isolado *C. truncatum* ocasionou lesões necróticas de fundo escuro no tratamento com nitrato de potássio e lesões necróticas de fundo claro no tratamento com extrato de levedura. Os mutantes CtM1 e CtM2 não promoveram lesões nos tecidos de *S. lycopersicum*.

*Colletotricum musae* e seu mutante CmM2 não ocasionaram lesões nos tecidos perfundidos. CmM1 causou lesões necróticas de fundo claro apenas na presença de nitrato de potássio.

Na presença de sorbitol o isolado Cs não ocasionou lesões nos tecidos perfundidos. No tratamento com nitrato de potássio o mutante CsM1 promoveu pequenas lesões necróticas de fundo claro restritas ao ponto de introdução da agulha, no tratamento com extrato de levedura as lesões foram amplas. O isolado CsM2 ocasionou lesões necróticas e murcha marginal nos tecidos perfundidos, no tratamento com nitrato de potássio essas lesões foram de fundo claro e no tratamento com extrato de levedura foram de fundo escuro.

Os isolados *C. truncatum* e CtM1 não ocasionaram lesões nos tecidos perfundidos. O isolado CtM2 promoveu lesões necróticas no tratamento com extrato de levedura.

*Colletotricum musae* promoveu pequenas lesões necróticas restritas ao ponto de introdução da agulha durante a perfusão, no tratamento com nitrato de potássio essas lesões

foram de fundo claro enquanto que no tratamento com extrato de levedura elas foram de fundo escuro. O isolado CmM1 ocasionou lesões necróticas de fundo escuro somente no tratamento com extrato de levedura. CmM2 promoveu um escurecimento dos tecidos perfundidos no tratamento com nitrato de potássio.

Figura 14 - Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam nitrato de potássio (A-J) e extrato de levedura (L-U) em sacarose. A e L - Controles, B e M - Cs, C e N - CsM1, D e O CsM2, E e P - Ct, F e Q - CtM1, G e R - CtM2, H e S - Cm, I e T - CmM1, J e U - CmM2.

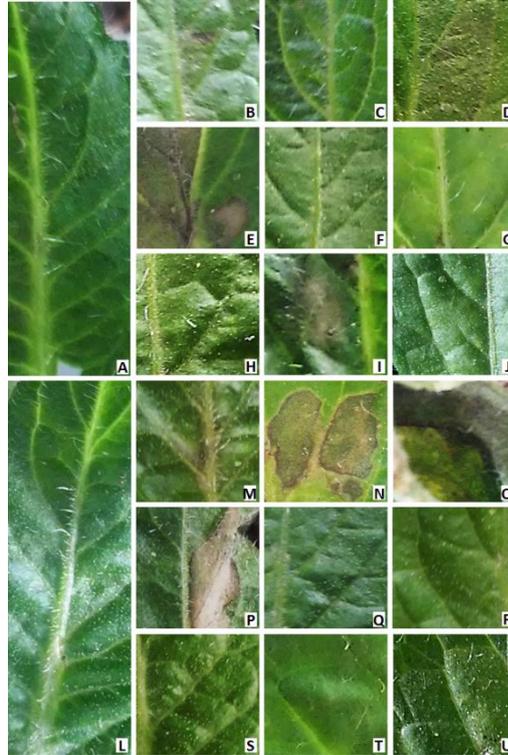
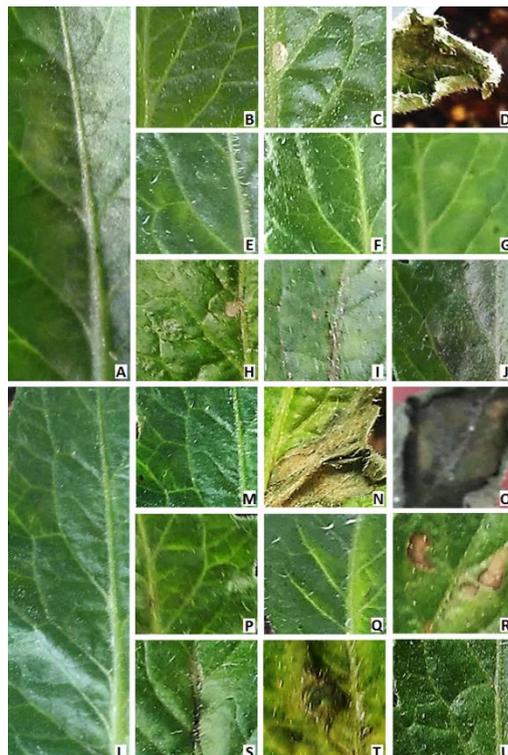
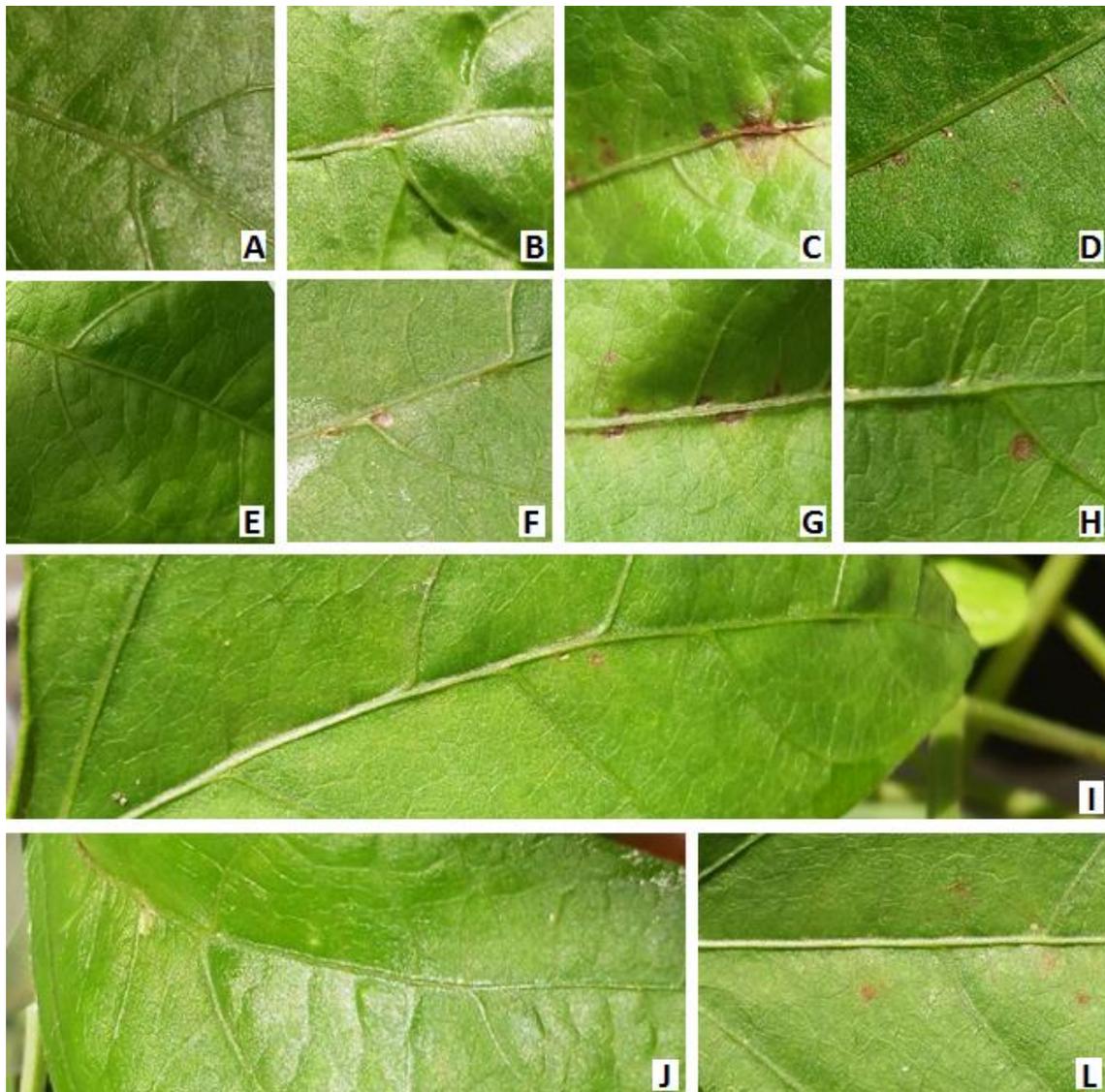


Figura 15 - Lesões induzidas em folhas de *S. lycopersicum* perfundidas com secretoma obtido de cultivos que combinavam nitrato de potássio (A-J) e extrato de levedura (L-U) em sorbitol. A e L - Controles, B e M - Cs, C e N - CsM1, D e O CsM2, E e P - Ct, F e Q - CtM1, G e R - CtM2, H e S - Cm, I e T - CmM1, J e U - CmM2.



A perfusão nos tecidos foliares de *Phaseolus lunatus* revelou que algumas das infiltração do secretoma obtido dos isolados selvagens e mutantes ocasionaram pequenas lesões necróticas amarronzadas. (Figura 16). No tratamento sacarose nitrato de potássio somente os isolados CsM2, Ct e CmM2 ocasionaram lesões, com sacarose extrato de levedura CsM1, Ct e CmM1 ocasionaram lesões. No tratamento sorbitol nitrato de potássio não houveram lesões, porém houveram injúrias do ato de perfusão, com sorbitol extrato de levedura apenas o isolado CmM2 ocasionou lesões.

Figura 16 - Lesões induzidas em folhas de *Phaseolus lunatus* perfundidas com nitrato de potássio (A-D e I) e extrato de levedura (E-H e J-L) respectivamente em sacarose e sorbitol. A, E, I, J - Controles, B – CsM2, C e G – Ct, D e L - CmM2, F – CsM1, H – CmM1.



#### 4.4. Discussão

A espontaneidade de mutações que conferem resistência a clorato (PEREIRA et al., 2003) foi corroborada nesse ensaio pelo elevado número de colônias resistentes isoladas (66 colônias). No estudo foram escolhidas aleatoriamente duas colônias oriundas de cada tipo selvagem que foram utilizadas no experimento que confirmou-as como mutantes Nit. O número relativamente baixo de colônias submetidas ao teste que confirmou a mutagênese é explicado pelo grande número de parcelas experimentais exigidas pelo delineamento e tratamento estatísticos empregados nos ensaios que se seguiram. Foram 120 parcelas, das quais avaliou-se massa seca, massa fresca, variação de massa, produção de esporos, variação de pH e lesões teciduais.

No experimento para confirmação da mutagênese os isolados selvagens *Ct* e *Cm* comportaram-se como o esperado não diferenciando significativamente do controle. O isolado selvagem *Cs* exibiu diâmetro de 14 mm diferindo do controle e demais selvagens. Tal fenômeno pode ser atribuído a natureza do inóculo utilizado no experimento em questão, disco de meio de cultivo mínimo acrescido de 150 mM de clorato de potássio e 100 g/L de batata. O caldo de batata contém outros compostos nitrogenados que podem ter sido preferencialmente utilizados por *Cs* para crescer antes de intoxicar-se pela captação do clorato presente no meio de cultivo. Glutamina e amônio são fontes preferenciais de nitrogênio para fungos (CADDICK et al., 1994; MARZLUF, 1997; PEREIRA et al., 2003). A diferença de comportamento de *Cs* em relação aos demais selvagens pode ter várias explicações: (i) *Cs* pode ser menos sensível ao clorato que as demais espécies, (ii) *Cs* pode ser mais eficiente em aproveitar quantidades residuais de glutamina e amônio do disco de meio de cultivo contendo micélio usado como inóculo, ou ainda (iii) *Cs* utilizou reservas de nitrogênio contidas no micélio inóculo para esse crescimento inicial.

As colônias resistentes ao clorato confirmaram ser mutantes Nit por crescerem na presença de clorato de potássio a 150mM como única fonte de nitrogênio. Sabendo que os mutantes Nit são incapazes de reduzir o clorato a clorito, logo não são intoxicados e não tem seu desenvolvimento prejudicado.

No ensaio onde foram fornecidas duas fontes de nitrogênio para os Tipos selvagens e para os mutantes Nit, nos tratamentos com nitrato de potássio os mutantes apresentaram crescimentos reduzidos como era esperado devido a natureza da sua mutação. Nos tratamentos com extrato de levedura foi observado um desempenho superior dos mutantes em relação aos Tipos selvagens, pois o extrato de levedura é uma fonte orgânica que disponibiliza ao fungo uma gama de compostos nitrogenados úteis para os mutantes Nit.

Na avaliação da massa fresca foi possível observar que os Tipos selvagem tiveram melhor desempenho na sacarose do que no sorbitol. Considerando as fontes de nitrogênio, *Cs* e *Ct*

foram mais sensíveis a nitrato de potássio e *Cm* foi a extrato de levedura. Todos os mutantes Nit foram sensíveis a nitrato de potássio como era esperado. Analisando a variável Massa seca percebe-se que os Tipos selvagens foram mais sensíveis a fonte de carbono sacarose e a fonte de nitrogênio nitrato de potássio, com exceção do isolado *Cm* que foi mais sensível a extrato de levedura. Os mutantes foram mais sensíveis a sacarose entre as fontes de carbono e, como esperado, todos os mutantes Nit foram sensíveis a nitrato de potássio.

Os resultados para variação de massa mostram os menores valores na presença de nitrato de potássio independentemente da fonte de carbono associada. Os menores valores registrados nesse tratamento nas variáveis Massa fresca, Massa seca e Variação de massa corroboram entre si no sentido em que menores quantidades de micélio acumulam menores quantidades de líquido e por isso produzem menores variações de massa.

A produção de esporos revelou que sorbitol combinado com extrato de levedura foi a melhor associação para estimular a esporulação, embora tenha ocorrido esporulação somente do isolado *Cm* e seus respectivos mutantes. O tratamento sacarose e extrato de levedura o Tipo selvagem não esporulou ao passo que seus mutantes sim, diferindo significativamente. Jackson e Bothast (1990) e Patel e Gupte (2016) verificaram que meios de cultivo com baixas concentrações de carbono combinadas com fontes complexas e orgânicas de nitrogênio incrementam a esporulação de *Colletotrichum* sp., corroborando o observado para o meio de cultivo com extrato de levedura no presente experimento.

No cultivo *in vitro* de fungos o aumento do pH do ambiente está associado ao acúmulo de amônio extracelular. Vários genes são induzidos especificamente durante o estresse de nitrogênio. (DONOFRIO et al. 2006). Tal estresse desencadeia a síntese de enzimas que catabolizam o nitrogênio contido no meio de cultivo e o disponibiliza para o fungo. O amônio e a glutamina são as formas preferenciais de absorção de nitrogênio pelos fungos, quando ausentes podem ser catabolizadas de compostos inorgânicos como por exemplo o nitrato por reduções sequenciais. (PEREIRA et al., 2003).

Analisando a variação de pH foi possível observar a alcalinização esperada apenas no tratamento sorbitol extrato de levedura. De modo geral os tratamentos com nitrato de potássio foram acidificados. A condição de mutante Nit implica na impossibilidade de usar o nitrato como fonte de nitrogênio, logo esses isolados obtiveram melhor desempenho fisiológico na presença de extrato de levedura o que refletiu na alcalinização do meio de cultivo devido provavelmente a fontes alternativas de nitrogênio. Solomon e Oliver (2001) relataram a presença de glutamina, glutamato, alanina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no meio

intercelular de tomateiros e apontaram a possibilidade de utilização dessas fontes na nutrição de fitopatógenos. Essa utilização acumula amônio e por isso alcaliniza o meio intercelular.

O pH é um importante fator para a atividade de enzimas, o ambiente alcalino é necessário à atividade e expressão de algumas enzimas incluindo a pectato liase codificada pelo gene *pelB*, um fator de virulência para *C. gloeosporioides* patógeno do abacate (DRORI et al., 2003; YAKOBY et al., 2001). Essas e outras ECP's reguladas por estresse nutricional muitas vezes são capazes de produzir sintomas característicos das doenças (TALBOT et al., 1997).

Tipicamente entre as ECP's estão enzimas envolvidas com a degradação de carboidratos e proteases. (YANG et al., 2012; PHALIP et al., 2005; PAPER et al., 2007). Por isso lesões teciduais são formadas durante o desenvolvimento da doença ou quando o secretoma produzido *in vitro* é perfundido no tecido vegetal. No ensaio de perfusão tecidual e avaliação de lesões geradas pelos secretomas foi possível registrar a maior diversidade e quantidade de lesões em *S. lycopersicum* quando comparado a *P. lunatus*. Não obstante a composição do secretoma e a secreção de efetores e outras proteínas de fungos hemibiotróficos sofre influência e regulação dos sinais oriundos da planta hospedeira (McCOTTER et al., 2016; CHAUDHARI et al., 2014; VLEESHOUWERS E OLIVER, 2014), isso pode explicar o comportamento diferenciado entre *Sl* e *Pl* perfundidos com secretoma produzido *in vitro*, apontando para uma baixa regulação por *Sl* e alta por *Pl*. Talvez a produção de secretoma *in vivo* possa refletir fielmente a especificidade natural de patogenicidade.

Os tratamentos com sorbitol e com extrato de levedura ocasionaram injúrias mais consistentes com a relação de patogenicidade natural dos Tipos selvagens com o hospedeiro e favoreceram, sobretudo, a atividade dos mutantes Nit. As lesões causadas exclusivamente pelos mutantes nesses tratamentos pode ser explicadas pela natureza dos mutantes que não podem aproveitar o nitrogênio do nitrato de potássio para sintetizar as enzimas celulolíticas e outras necessárias a produção de lesões no tecido foliar.

#### 4.5. Conclusões

Mutantes Nit de *Colletotrichum* foram facilmente acessados pela seleção de mutações espontâneas para resistência a clorato de potássio. A espécie *C. siamense* parece ser menos sensível a clorato que *C. truncatum* e *C. musae*.

A produção de biomassa foi afetada por sacarose e nitrato de potássio tanto entre os Tipos selvagens quanto entre os mutantes. Somente *C. musae* e seus mutantes Nit esporularam diferindo significativamente das testemunhas. A associação sorbitol extrato de levedura sustentou a maior produção de esporos.

Os cultivos com nitrato de potássio foram acidificados e os com extrato de levedura foram alcalinizados, sobretudo quando associado a sorbitol.

Os secretomas foram mais ativos contra os tecidos foliares de *S. lycopersicum* do que os de *P. lunatus*. Os tratamentos com sorbitol e com extrato de levedura ocasionaram lesões mais consistentes com a relação de patogenicidade natural, entre Tipos selvagens e hospedeiros, como também e favoreceram a atividade dos mutantes.

## REFERÊNCIAS

- ABANG, M.M. Vegetative compatibility among isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.) in Nigeria. **Journal of Phytopathology**. v.152, p.21–27. 2004.
- AMUTAN, M. et al. Identification and cloning of a mobile transposon from *Aspergillus niger* var. *awamori*. **Current Genetics**. v.29 p.468–473, 1996.
- BEYNON, S.M. et al. Genetic variation in the coffee berry disease pathogen, *Colletotrichum kahawae*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v.46, p.457–470, 1995.
- CADDICK, M.X.; PETERS, D.; PLATT, A. Nitrogen regulation in fungi. **Antonie van Leeuwenhoek**. v.64, p.169-177, 1994.
- CASELA, C.R.; FREDERIKSEN, R.A. Pathogenic variation in monoconidial culture from a single lesion and monoconidial subcultures of the sorghum anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*. **Fitopatologia Brasileira**. v.19, p.149–153, 1994.
- CHAUDHARI, P. et al. Effector biology during biotrophic invasion of plant cells. **Virulence**. v.5, p.703–709, 2014.
- COVE, D.J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: the selection and characterization of chlorate resistant mutants. **Heredity**. v.36, p.191–203, 1976a.
- COVE, D.J. Chlorate toxicity in *Aspergillus nidulans*: studies of mutants in nitrate assimilation. **Molecular and General Genetics**. v.146, p.147–159, 1976b.
- COVE, D.J. Genet studies of nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. **Biological Reviews**. v.54, p.291-327, 1979.
- CRAWFORD, N.M.; ARST, H.N. The molecular genetics of nitrate assimilation in fungi and plants. **Annual Review of Genetics**. v.27, p.115–146. 1993.
- DABOUSSI, M.J. Fungal transposable elements: generators of diversity and genetic tools. **Journal of Genetics**. v.75, p.325–339, 1996.
- DABOUSSI, M.J.; CAPY, P. Transposable elements in filamentous fungi. **Annual Review of Microbiology**. v.57, p.275–299, 2003.
- DRORI, N. et al. External pH and Nitrogen Source Affect Secretion of Pectate Lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Applied and Environmental Microbiology**. v.69, n.6, p.3258–326, 2003.
- FURGAL-WEGRZYCKA, H. Genetic relatedness of *Colletotrichum* species from Leguminosae by examination of vegetative compatibility. **Acta Microbiologica Polonica**. v.46, p.83–93, 1997.
- INGRAM, P.R. et al. The interaction of sodium chlorite with phospholipids and glutathione: a comparasion of effects in vitro, in mammalian and in microbial cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v.410, p.121-133, 2003.

KIM, S.G. et al. In-depth insight into in vivo apoplastic secretome of rice-*Magnaporthe oryzae* interaction. **Journal of Proteomics**. v.78, p.58–71, 2013.

KLITTICH, C.J.R.; LESLIE, J.F. Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). **Genetics**.v.118, P.417–423, 1988.

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

MARZLUF, G.A. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.61, p.17-32, 1997.

MAURER, P. et al. Isolation of the transposable element hupfer from the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* by insertion mutagenesis of the nitrate reductase structural gene. **Molecular and General Genetics**. v.256, p.195–202, 1997.

Mc COTTER, S.W.; HORIANOPOULUS, L.C.; KRONSTAD, J.W. Regulation of the fungal secretome. **Current Genetics**. v.62, p.533–545, 2016.

MEINHARDT, L.W. et al. Genome and secretome analysis of the hemibiotrophic fungal pathogen, *Moniliophthora roreri*, which causes frosty pod rot disease of cacao: mechanisms of the biotrophic and necrotrophic phases. **BMC Genomics**. v.15, p.164–179, 2014.

PAPER, J. et al. Comparative proteomics of extracellular proteins *in vitro* and *in planta* from the pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. **Proteomics**. v.7, p.3171–3183, 2007.

PHALIP, V. et al. Diversity of the exoproteome of *Fusarium graminearum* grown on plant cell wall. **Current Genetics**. v.48, p.366–379, 2005.

REDMAN, R.S.; RODRIGUEZ, R.J. Characterization and isolation of an extracellular serine protease from the tomato pathogen *Colletotrichum coccodes*, and its role in pathogenicity. **Mycological Research**. v.106, n.12, p.1427–1434, 2002.

SOUZA-PACCOLA, E.A. et al. Genetic recombination in *Colletotrichum sublineolum*. **Journal of Phytopathology**. v.151, p.329–334, 2003.

VLEESHOUWERS, V.G.; OLIVER, R.P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. **Molecular Plant-Microbe Interactions**. v.27, p.196–206, 2014.

YAKOBY, N.; et al. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. **Molecular Plant-Microbe Interactions Journal**. v.14, p.988–995, 2001.

YANG, F. et al. Secretomics identifies *Fusarium graminearum* proteins involved in the interaction with barley and wheat. **Molecular Plant Pathology**. v.13, p.445–453, 2012.