



# Processo infeccioso e atividade de enzimas em plântulas de macieira de genótipo resistente ou suscetível à mancha foliar de *Glomerella* causada por *Colletotrichum gloeosporioides*

Leonardo Araújo & Marciel J. Stadnik

Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900, Florianópolis, SC, Brasil

Autor para correspondência: Marciel J. Stadnik, e-mail: stadnik@cca.ufsc.br

## RESUMO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) é uma doença emergente e tem se tornado uma grande preocupação para os produtores brasileiros de maçã, porque a cultivar mais plantada, Gala, é altamente suscetível à doença. Desta forma, este trabalho teve como objetivos investigar as fases iniciais do processo infeccioso de *C. gloeosporioides* e verificar o envolvimento das enzimas peroxidase (POD) e  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) em plântulas de macieira de genótipo suscetível ('Gala') e resistente ('Fuji'). Para tanto, plântulas com 75 dias foram inoculadas com *C. gloeosporioides* e a severidade da MFG foi avaliada aos 10 dias pós-inoculação. Os eventos iniciais da infecção (germinação dos conídios e a formação de apressórios) de *C. gloeosporioides* foram avaliados às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Paralelamente, a atividade da POD e GLU foi monitorada nos mesmos intervalos de tempo. Plântulas do genótipo resistente não apresentaram sintomas da MFG, enquanto que as do genótipo suscetível exibiram 11% de severidade média. O padrão dos eventos iniciais de penetração do *C. gloeosporioides* foi o mesmo em ambos os genótipos. A resistência cultivar-específica foi associada a um aumento da atividade de POD, enquanto que a atividade de GLU não variou entre os genótipos.

**Palavras-chave:** *Malus domestica*, apressório,  $\beta$ -1,3-glucanases, peroxidases, resistência.

## ABSTRACT

**Infectious process and activity of enzymes in apple seedlings of genotype resistant or susceptible to *Glomerella* leaf spot caused by *Colletotrichum gloeosporioides***

The *Glomerella* leaf spot (GLS) is an emerging disease and has become a major concern to Brazilian apple producers because the most widely grown cultivar, 'Gala', is highly susceptible to the disease. So, this study aimed to investigate the early stages of infectious process of *C. gloeosporioides*, and understand the role of peroxidase (POD) and  $\beta$ -1,3-glucanases (GLU) in susceptible ('Gala') and resistant ('Fuji') apple seedling genotypes. Seedlings (75 days-old) were inoculated with *C. gloeosporioides* and the severity of GLS was assessed at 10 days after inoculation. Conidial germination and appressoria formation of *C. gloeosporioides* were evaluated at 24, 48 and 72 hours after inoculation. Enzyme activity for POD and GLU were also determined at the same time interval. Seedlings of the resistant genotype did not show symptoms of GLS, whereas the susceptible genotype exhibited 11% of necrotic leaf area. The early penetration events of *C. gloeosporioides* were similar in both genotypes. Cultivar-specific resistance was associated with an enhanced POD activity, while GLU activity was similar in both genotypes.

**Key words:** *Malus domestica*, appressoria, peroxidases,  $\beta$ -1,3-glucanases, resistance.

## INTRODUÇÃO

A mancha foliar de *Glomerella* (MFG) é uma doença emergente da macieira (*Malus domestica* Borkh.) e que ocorre com maior intensidade em regiões de clima subtropical úmido, como Sudeste dos EUA (González et al., 2006) e Sul do Brasil (Becker et al., 2000). A MFG se desenvolve geralmente com verões chuvosos e tem se tornado uma grande preocupação nos últimos anos no

Brasil, onde a cultivar mais plantada ('Gala') é altamente suscetível. Sob tais condições, a doença pode resultar em desfolha intensa (superior a 75%), reduzindo o rendimento e enfraquecendo as reservas nutricionais das plantas (Becker et al., 2000; González et al., 2006).

A MFG pode ser causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. e *Colletotrichum acutatum*, porém a primeira espécie parece ser mais importante devido à sua dominância nas populações e maior agressividade (Crusius et al., 2002; González et al., 2006). Os primeiros sintomas da doença são manchas vermelho-arroxeadas que aparecem ao redor de dois dias após a inoculação. As manchas evoluem para lesões necróticas de formato irregular, podendo ocasionar a queda das folhas

Parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis SC. 2010.

com aproximadamente 10 dias após a inoculação em casa-de-vegetação. (Araujo et al., 2008).

Eventos das fases iniciais do desenvolvimento de estruturas infectivas de *Colletotrichum* spp tais como a germinação e a formação de apressórios possuem semelhanças entre si em diferentes patossistemas (Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004; Peres et al., 2005). Apesar de existirem informações sobre as fases de infecção de *Colletotrichum* spp. em outras espécies vegetais, para MFG alguns processos como as relações entre patógeno e hospedeiro ainda são pouco conhecidos (Stadnik et al., 2009).

Quanto ao controle da MFG, o uso de fungicidas têm sido a principal tática empregada (Becker et al., 2000), sendo especialmente aplicados preventivamente ou logo que os sintomas iniciais sejam observados e repetidos sempre que ocorra acúmulo de 30 milímetros ou mais de chuva (Becker et al., 2000; Crusius et al., 2002). Apesar de eficientes, aplicações frequentes de fungicidas aumentam os custos de produção e também podem ter efeitos danosos sobre o meio ambiente e a saúde humana (Stadnik et al., 2009; Furlan et al., 2010).

A cv. Gala descendente do grupo Golden Delicious é a maçã mais consumida no mundo é altamente suscetível a MFG. Por outro lado, as que descendem do grupo Delicious, como cv. Fuji apresentam resistência completa à doença, sendo de caráter monogênico recessivo (Becker et al., 2000; Dantas et al., 2009; Furlan et al., 2010). Em estudos com acessos de macieira do grupo Golden Delicious, Furlan et al. (2010) não encontraram diferenças significativas quanto à resistência à MFG e por isso concluíram que, atualmente, as cultivares de maçã que levam genes de resistência à MFG como a Fuji (grupo Delicious) são uma das únicas fontes para estudo e desenvolvimento de novas variedades.

Um dos mecanismos de defesa mais comuns e eficientes ativados após o reconhecimento de patógenos é a síntese de proteínas relacionadas à patogênese (Métraux, 2001), como por exemplo peroxidases (PODs) e  $\beta$ -1,3-glucanases (GLUs) (Van Loon et al., 2006). POD cataliza a oxidação e polimerização de álcool hidrocínâmico na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), produzindo a lignina, que juntamente com a celulose e outros polissacarídeos se acumulam na parede celular das células vegetais e funcionam como uma barreira física à penetração fúngica (Stadnik & Buchenauer, 2000). O aumento da atividade de POD tem sido associado com a resistência em macieira, contra fogo bacteriano (Brisset et al., 2000; Hassan & Buchenauer, 2007) e em mangueira contra *C. gloeosporioides* (Zhu et al., 2008).

Já GLUs são enzimas líticas que hidrolisam o  $\beta$ -1, 3 glucanas, um dos principais componentes das paredes celulares de bactérias e fungos (Van Loon et al., 2006). O aumento da atividade de GLU tem sido associado com a resistência em macieira, contra fogo bacteriano (Brisset et al., 2000) e podridões de pós-colheita (El Ghaouth et al.,

2002). Em outras espécies de plantas, níveis mais elevados de resistência a doenças causadas por *Colletotrichum* spp. vêm sendo também relacionados a uma maior expressão de GLU, e restrição do desenvolvimento do fungo (Nantawanit et al., 2010). O objetivo deste trabalho foi investigar e comparar os eventos iniciais do processo infeccioso de *C. gloeosporioides* em genótipos de macieira resistente e suscetível à doença, além de entender o papel das enzimas POD e GLU na resistência cultivar-específica à MFG.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal condições de crescimento e inoculação

Plântulas de macieira foram obtidas de sementes de acordo com metodologia adaptada de Brisset et al. (2000) e Hassan & Buchenauer (2007). Para tanto, as sementes oriundas do cruzamento das cv. Gala e Fuji foram distribuídas em caixas plásticas do tipo 'gerbox' entre camadas de algodão umedecido e, em seguida, armazenadas a 5°C por 50 dias para a quebra de dormência. Sementes germinadas que apresentavam radículas de comprimento  $\geq 2$ cm foram transferidas para sementeiras de isopor, contendo solo e mantidas sob condições casa-de-vegetação sem controle de umidade, temperatura e fotoperíodo.

Quando as plântulas atingiram o estágio de três a quatro folhas elas foram transplantadas para vasos plásticos individuais contendo 1 L de uma mistura de composto orgânico e solo argiloso (1:2, v/v), onde cresceram por mais 45 dias até apresentarem de 10 a 15 folhas expandidas. As plântulas foram irrigadas de acordo com as suas necessidades hídricas e adubadas individualmente com 0,25 g de fosfato monoamônio (12-61-0/ NPK). Oídio e pulgões foram controlados com pulverizações semanais de enxofre 80% (3 g/L) e inseticidas deltametrina (3 mL/L), respectivamente. Antes de iniciar o experimento, o excesso de enxofre residual foi removido por lavagem das folhas.

Os genótipos dos segregantes suscetíveis ou resistentes à MFG, foram identificados por meio de um bioensaio em folha destacada de acordo com metodologia adaptada de Liu et al. (2007). Para isso, a última folha expandida foi destacada quando as plântulas tinham 40 dias de idade e pulverizada com uma suspensão conidial de *C. gloeosporioides* ( $10^5$  conídios/mL). Oito dias após a incubação em câmara úmida a 25°C e fotoperíodo de 12 h, as folhas foram avaliadas quanto à incidência e severidade visual da MFG de acordo com Araujo et al. (2008). Indivíduos suscetíveis e que exibiram níveis similares de severidade de doença foram selecionados, enquanto que os indivíduos resistentes foram identificados pela ausência de sintomas nas folhas.

O isolado CGF1 de *C. gloeosporioides* proveniente da coleção da Embrapa Uva e Vinho foi mantido em meio BDA. Para obtenção de inóculo, discos de 8 mm das culturas fúngicas foram transferidos para placas de Petri com meio de cultura BDA. Após dez dias a 25°C e 12 h de fotoperíodo, as colônias foram raspadas superficialmente

com alça de Drigalsky e a concentração da suspensão de conídios foi determinada com câmara de Neubauer.

Plântulas dos genótipos suscetíveis e resistentes foram inoculadas por aspersão com uma suspensão de  $3 \times 10^5$  conídios/mL de *C. gloeosporioides* até o ponto de escorrimento. As pulverizações foram realizadas com auxílio de pistola acoplada a motocompressor de ar. Plântulas inoculadas foram mantidas no escuro a 26°C com 100% de umidade relativa por 24 h e, posteriormente transferidas para as bancadas da casa-de-vegetação, onde permaneceram até a avaliação da severidade.

#### **Avaliação da doença**

A severidade (proporção de área foliar com tecido necrosado) da MFG foi avaliada aos 10 dias após a inoculação (d.a.i.). Para tal, todas as folhas (de 10 a 15) das plântulas foram destacadas, sendo dispostas entre uma placa de vidro transparente (28 x 21 x 0,8 cm) e uma lâmina com fundo preto para serem digitalizadas com um scanner. A proporção de área foliar necrosada foi determinada com auxílio do programa Quant® (v.1.01; Universidade Federal de Viçosa, 2003).

#### **Análise microscópica do processo infeccioso**

Das plântulas de ambos genótipos, retiraram-se dois discos da 2ª e 3ª folhas expandidas com auxílio de um vazador (8 mm diâmetro) às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.). Após a coleta, os discos foram imediatamente depositados com a superfície adaxial voltada para cima em placas de Petri (9 cm) contendo papel de filtro, previamente umedecido com solução de etanol e ácido acético (3:1, v/v), para a retirada da clorofila dos tecidos. A solução foi trocada periodicamente durante dois dias. Em seguida, os discos foram conservados em solução de lactoglicerol, ácido láctico e água destilada (1:1:1 v/v/v) (Stadnik & Buchenauer, 2000).

A análise microscópica foi realizada com auxílio de um microscópio de luz, binocular, no aumento de 400X (modelo FWL1500, Feldemann Wild Leite, Brasil). Para visualização das estruturas do fungo, os discos foliares foram montados em lâminas de vidro e corados com azul de Aman em lactofenol (ácido láctico, 10 mL; glicerina, 10 mL; ácido fênico 10 g; azul de algodão, 0,1 g e água destilada, 10 mL).

A germinação foi determinada em 100 conídios sobre os discos foliares e expressa em percentual. Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram a emissão de um tubo germinativo maior que a largura do próprio conídio, ou quando foi formado um apressório (Morin et al., 1996). Dos conídios germinados determinou-se a frequência de duas classes: i. conídios que emitiram tubo germinativo e não formaram apressório; ii. conídios que emitiram tubo germinativo que se diferenciaram em apressório melanizado. Os conídios e as estruturas de infecção do fungo foram fotografados com uma câmera digital acoplada ao microscópio (5.1 megapixels, modelo cyber-shot DSC-P93, Sony, Brasil).

#### **Extração e quantificação protéica**

Para a obtenção do extrato protéico, utilizou-se o tecido remanescente da 2ª e 3ª folha expandida de acordo com metodologia adaptada de Brisset et al. (2000) e Hassan & Buchenauer (2007) às 24, 48 e 72 h.a.i. As folhas foram embaladas em papel alumínio, congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -20°C até o momento da extração protéica.

Amostras de folhas foram maceradas usando-se almofariz e pistilo de porcelana na presença de nitrogênio líquido. O pó foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 7,5) na proporção de 1:4 (p/v) contendo triton x-100, 01% (Sigma-Aldrich, USA), polivinilpolipirrolidona 1% (Sigma-aldrich, USA), 1mM EDTA (Sigma-Aldrich, USA), 1mM fluoreto de fenilmetilsulfonila (Sigma-Aldrich, China) e 1mM 2-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich, Japão). Após a centrifugação a 20.000 g por 30 min a 4°C (centrífuga modelo 5804R, Eppendorf, Alemanha), o sobrenadante foi coletado e dividido em duas partes iguais. Uma parte foi armazenada a -20°C para posterior avaliação da atividade de GLU, enquanto outra foi mantida sob gelo para a determinação imediata de proteínas e atividade da POD. O teor de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), usando como proteína padrão albumina de soro bovina (BSA, Sigma, USA).

#### **Determinação da atividade de POD e GLU**

A atividade da POD foi determinada por espectrometria de acordo com a metodologia adaptada de Stadnik & Buchenauer (2000). Para tal, 100 µL do extrato protéico foram adicionados em 2,9 mL de tampão acetato de sódio (50 mM; pH 5,5), contendo guaiacol 0,25% (v/v) (Sigma, EUA) e 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Alemanha). Os valores de absorbância de reação foram registrados a cada 30 s durante 3 min a 30°C por meio de um espectrofotômetro a 470 nm (modelo 700 Plus, Femto, Brasil). A atividade de POD foi expressa em unidades de Densidade Óptica a 470 nm/mg proteína/min.

A atividade de GLU foi determinada segundo a metodologia adaptada de Wirth & Wolf (1996) e Brisset et al. (2000). Carboximetilcurdlan-remazol azul brilhante (CM-curdlan-RBB, Loewe Biochemica, Alemanha) foi usado como substrato. Uma quantidade de 200 µL de CM-curdlan-RBB (4,0 mg/mL) e 200 µL de tampão acetato de sódio (200 mM; pH 5,0) foram pipetados em microtubos de 2 mL, centrifugadas por 5 s e incubadas à 40°C em banho-maria por 10 min. Depois disso, 400 µL do extrato bruto das amostras foram adicionados, a mistura foi agitada novamente e então incubada a 40°C em banho-maria por 2 h. Após parar a reação com 200 µL de HCl 2N e manter em gelo por 10 min as amostras foram centrifugadas por 10.000 g por 10 min. Em seguida a absorbância do sobrenadante das amostras foi determinada a 600 nm com auxílio de um espectrofotômetro. A atividade de GLU foi expressa em unidades de Densidade Óptica a 600 nm/mg proteína/min.

### Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com cinco repetições por tratamento, sendo que cada unidade experimental foi constituída de uma plântula por vaso. Para a avaliação do processo infeccioso (germinação e formação de apressórios), cada unidade constou de quatro discos/plântula. Para determinação da atividade enzimática cada unidade foi composta pelo tecido remanescente de duas folhas/plântula. Foram realizados dois experimentos independentes em diferentes momentos com resultados semelhantes para genótipos resistentes e suscetíveis. Elegeram-se um experimento representativo para mostrar os resultados.

Depois de verificada a homogeneidade das variâncias, os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com esquema fatorial (tempo x genótipo - 3x2) e ao teste Tukey a 5% de probabilidade para a separação de médias. As análises estatísticas foram feitas no programa Statistica 6.0 - Stat Soft®, versão 2001.

## RESULTADOS

### Severidade da MFG

Plântulas dos genótipos suscetíveis e resistentes previamente selecionados pelo método de inoculação em folha destacada confirmaram as respectivas reações de resistência durante os experimentos em casa-de-vegetação. Ou seja, plântulas do genótipo resistente não apresentaram sintomas, enquanto que as do genótipo suscetível exibiram 11% de severidade média aos dez d.a.i., estimado com auxílio do programa QUANT.

### Germinação e formação de apressório

Pela análise de variância somente o fator tempo foi significativo para a germinação de conídios e formação

de apressórios, com uma tendência de incremento nos valores ao longo do tempo. Por exemplo, às 24 h.a.i., a germinação de conídios foi de 57,6%, incrementando para 86,3% em média às 48 e 72 h.a.i. (Figura 1 e 2). Dos conídios germinados, às 24 h.a.i., observou-se que cerca de 30% desses formaram apressórios sobre folhas de ambas cultivares, aumentando para 50% às 48 e 72 h.a.i. (Figura 3). Na comparação dos genótipos, esses não se diferenciaram significativamente quanto a essas duas variáveis ( $P \geq 0,05$ ) (Figura 2 e 3).

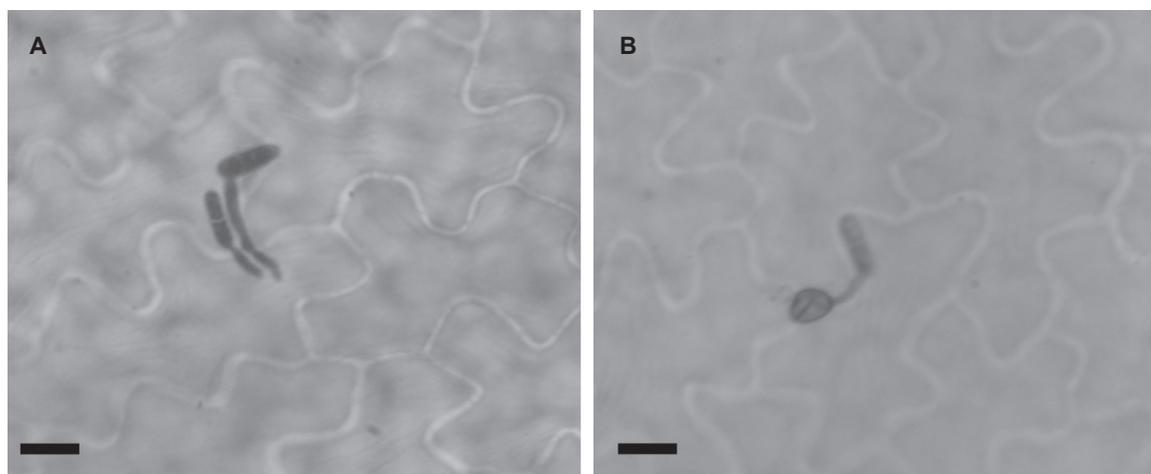
### Teor de proteínas totais

Pela análise de variância fatorial somente o fator tempo apresentou efeito significativo. Não houve diferença estatística para o teor de proteínas totais em genótipos suscetíveis e resistentes. No entanto, o teor de proteína médio às 72 h.a.i. foi 91% superior ao valor registrado às 24 h.a.i. (Tabela 1).

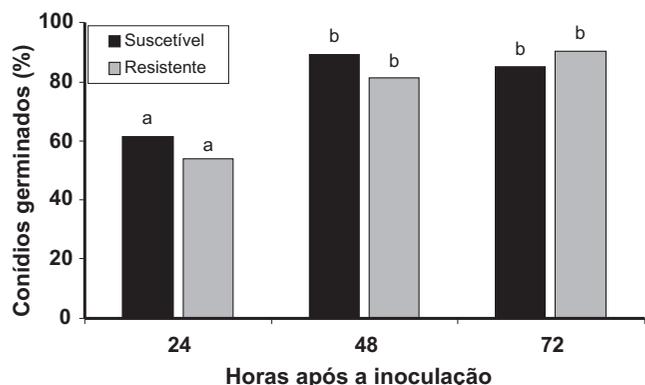
### Atividade de POD e GLU

Pela análise de variância fatorial os fatores tempo e genótipo apresentaram efeito significativo para atividade de POD. Para a atividade de GLU somente o fator tempo apresentou efeito significativo. A interação entre os fatores foi significativa a 5% de probabilidade somente para a atividade da POD.

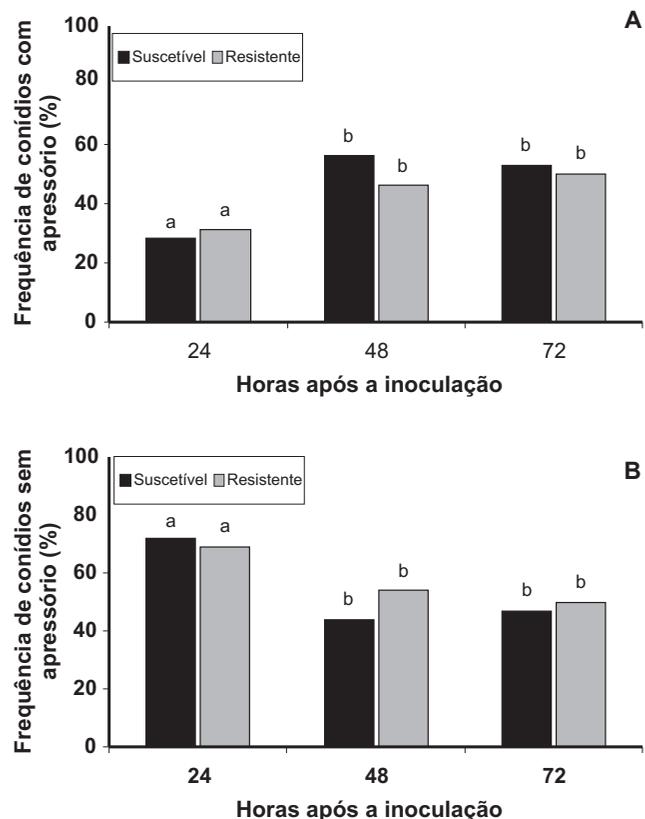
A atividade máxima de POD foi verificada às 72 h.a.i. em ambos os genótipos. A atividade de POD no genótipo resistente foi 41,2% maior que aquela mensurada do genótipo suscetível. Plântulas com resistência cultivar-específica apresentaram o maior valor da atividade de POD às 72 h.a.i. (Figura 4A). A atividade máxima de GLU foi observada às 24 h.a.i. e não houve diferença estatística entre os genótipos (Figura 4B).



**FIGURA 1** - Eventos iniciais da infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* na superfície adaxial de folhas de macieira às 48 horas após a inoculação. **A.** Conídios germinados sem apressório; **B.** Conídio germinado com apressório. Barras = 10µm.



**FIGURA 2** - Germinação de conídios de *Colletotrichum gloeosporioides* na superfície adaxial de folhas de macieira de genótipo suscetível e com resistência cultivar-específica às 24, 48 e 72 horas após a inoculação. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



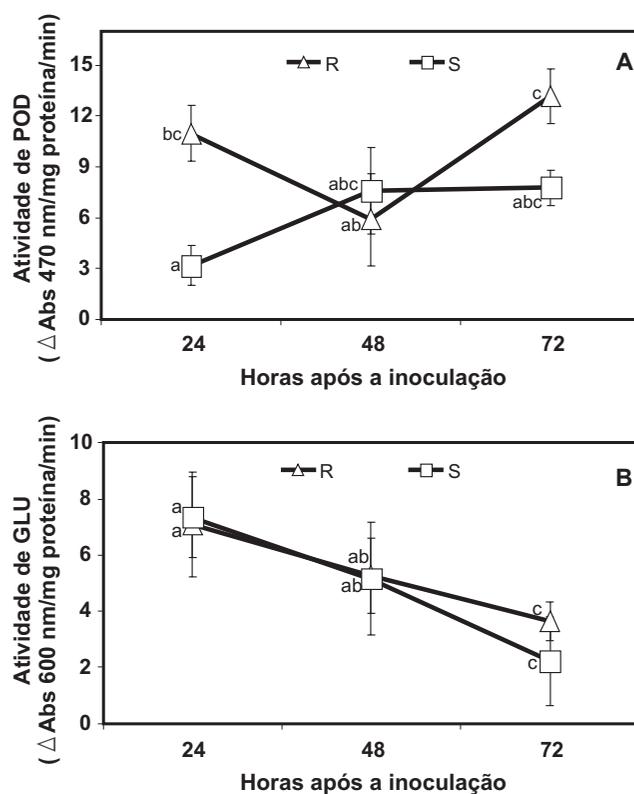
**FIGURA 3** - Frequência de conídios germinados com (A) ou sem apressório (B) na superfície adaxial de folhas de macieira de genótipo suscetível ou resistente às 24, 48 e 72 horas após a inoculação com *Colletotrichum gloeosporioides*. Colunas seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

**TABELA 1** - Teores de proteínas totais em plântulas de macieira de genótipo suscetível e com resistência cultivar-específica às 24, 48 e 72 horas após a inoculação (h.a.i.) com *Colletotrichum gloeosporioides*

Genótipo	Proteína total (mg/g de peso fresco)		
	24 h.a.i.	48 h.a.i.	72 h.a.i.
Suscetível	0,87	1,10	1,84
Resistente	0,89	1,31	1,52 n.s.
Média	0,88a	1,20ab	1,68 b

n.s.= Não significativo pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para o fator genótipo.

Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade para o fator tempo.



**FIGURA 4** - A. Atividade de peroxidases (POD); e B.  $\beta$ -1,3 glucanase (GLU) em plântulas de macieira de genótipo suscetível (S) e com resistência cultivar-específica (R) às 24, 48 e 72 horas após a inoculação de *Colletotrichum gloeosporioides*. Barras em cada ponto representam o desvio padrão da média. Pontos seguidos pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

## DISCUSSÃO

Plântulas do genótipo resistente não apresentaram sintomas da MFG em condições de casa-de-vegetação, confirmando que a reação observada nos segregantes resistentes no bioensaio com folhas destacadas é de

caráter monogênico recessivo (Dantas et al., 2009). A resistência monogênica caracteriza-se por ter uma distribuição descontínua no fenótipo, de tal modo que indivíduos resistentes podem ser facilmente distinguidos dos suscetíveis (Kiralý et al., 2007). Tendo em conta que a ‘Gala’ é auto-incompatível (Hegedus, 2006) e a resistência a MFG é conferida por um gene maior (Dantas et al., 2009), a introdução de genes de resistência através de métodos tradicionais de melhoramento não deve ser difícil.

A partir da amostragem das 48 h.a.i., a germinação de conídios de *C. gloeosporioides* e formação de apressórios ocorreu em taxas maiores sobre folhas de ambos os genótipos (Figura 1, 2 e 3). Estes resultados estão de acordo com diversos trabalhos da literatura que relataram que *Colletotrichum* spp. podem apresentar maior taxa de germinação e formação de apressório em intervalos de tempo superiores às 24 h.a.i. sobre plantas como: *Stylosanthes guianensis* (Munaut & Maraite, 1998), guaranazeiro (Bentes & Matsuoka, 2002), sorgo (Basavaraju et al., 2009), oliveira (Gomes et al., 2009) e feijoeiro (Ishikawa et al., 2010). No entanto, em outros patossistemas como pimentão - *C. gloeosporioides* (Kim et al., 1999) e fumo - *C. orbiculare* (Shen et al., 2001) é possível detectar altas taxas de emissão de tubo germinativo e formação apressório até 24 h após o contato do fungo com frutos e folhas, respectivamente. A germinação e a diferenciação do tubo germinativo em apressório em *Colletotrichum* sp ocorrem entre 3 e 48 h após a deposição do conídio, e sua velocidade é fortemente influenciada por fatores ambientais e sinais químicos e/ou físicos presentes na superfície do hospedeiro (Mendgen et al., 1996; Deising et al., 2000; Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004).

Conídios de *C. gloeosporioides* germinaram e formaram apressório de modo semelhante na superfície de folhas de genótipos resistente ou suscetível (Figura 1, 2 e 3). Outros estudos com *C. gloeosporioides* em videira (Daikin & Milholland, 1984), malva (Morin et al., 1996), pimentão (Kim et al., 1999) e sorgo (Wharton et al., 2001), além de *C. lindemuthianum* - feijoeiro (Ishikawa et al., 2010) têm também revelado que os eventos iniciais de penetração não diferem em cultivares suscetíveis ou resistentes. Conídios emitem tubos germinativos, que formam apressórios globosos e melanizados, e que por sua vez emitem hifas peg de penetração que infectam diretamente células da epiderme (Wharton et al., 2001; Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004). No entanto, há relatos, em algumas interações (Munaut & Maraite, 1998; Basavaraju et al., 2009) que sugeriram uma menor frequência de germinação e formação apressórios de *Colletotrichum* sp. em genótipos resistentes, quando comparados a suscetíveis. Características químicas e físicas presentes nas folhas, tais como íons de cálcio, açúcares simples, monômeros de cera, etileno, hidrofobicidade e propriedades topográficas da planta podem afetar a germinação de *Colletotrichum* sp. e também a diferenciação do tubo germinativo em apressório (Mendgen et al., 1996; Munaut & Maraite, 1998; Deising et al., 2000; Basavaraju et al., 2009).

Diversos trabalhos têm demonstrado que diferenças durante processo infeccioso de *Colletotrichum* spp. em genótipos com diferentes níveis de resistência ocorrem somente após a penetração, durante o processo de colonização do fungo nos tecidos internos do hospedeiro (Morin et al., 1996; Shen et al., 2001; Wharton et al., 2001; Bentes & Matsuoka, 2002; Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004; Peres et al., 2005; Gomes et al., 2009). Após a penetração inter e intracelular das hifas infectivas de *Colletotrichum* spp. se iniciam os mecanismos de resistência no hospedeiro como: formação de papilas, acumulação de compostos fenólicos e fitoalexinas que paralisam o desenvolvimento ou matam o fungo (Wharton et al., 2001; Wharton & Diégues-Uribeondo, 2004; Peres et al., 2005; Basavaraju et al., 2009). No presente trabalho, os eventos iniciais de penetração foram os mesmos em ambas cultivares. Desta forma, a resistência cultivar-específica da macieira ‘Fuji’ parece atuar após a penetração e durante colonização de *C. gloeosporioides* em tecidos internos do hospedeiro. No entanto, estudos ultraestruturais com outras técnicas de microscopia são necessários para verificar qual a interferência no crescimento inter e intracelular de hifas primárias e secundárias de *C. gloeosporioides* em tecido resistente de macieira.

Embora não se tenha observado diferenças entre os genótipos no teor de proteínas um aumento gradual do teor de proteínas totais no tempo foi observado (Tabela 1), provavelmente devido à acumulação de proteínas PR após a inoculação. Sabe-se que o teor de diversas dessas proteínas é frequentemente incrementando durante a infecção por fungos patogênicos (Métraux, 2001; Van Loon et al., 2006).

Plântulas do genótipo resistente apresentaram maior atividade de POD, comparado às suscetíveis (Figura 4A). A indução de enzimas de defesa tais como POD tem sido reconhecida como resposta inicial de resistência em plantas (Métraux, 2001). Plantas resistentes reconhecem rapidamente a presença do patógeno e ativam seus mecanismos de defesa contra a invasão. Ao contrário, em plantas suscetíveis, o reconhecimento ocorre mais tardiamente e a planta pode ser infectada (Métraux, 2001; Wharton et al., 2001). Por exemplo, em cana-de-açúcar, plantas resistentes à podridão vermelha apresentam maior atividade de POD, comparado às suscetíveis nas fases iniciais de infecção (24 h.a.i.), controlando a infecção de *C. falcatum* (Asthir et al., 2009).

Apesar do papel das PODs não ser entendido completamente, este vem sendo frequentemente associado à biossíntese da parede celular, respostas a injúrias, resistência a doenças e reparos de feridas (Van Loon et al., 2006). PODs são responsáveis pela formação de lignina que se acumulam na parede celular das células vegetais, funcionando como uma barreira física à penetração fúngica (Stadnik & Buchenauer, 2000). A rápida lignificação da parede celular de plantas resistentes sob o apressório de *Colletotrichum* spp. é um dos mecanismos de defesa primordiais para evitar

a penetração do fungo em seus tecidos (Hammerschmidt & Kuc, 1982). Por exemplo, plantas de pepino previnem a infecção por *C. lagenarium* devido a um rápido acúmulo de lignina na parede celular (Hammerschmidt & Kuc, 1982). A resistência a doenças também pode ser mediada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que é frequentemente associada com a atividade de POD (Mlícková et al., 2004). Plantas de sorgo resistentes acumulam mais H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abaixo do apressório e ao redor das vesículas de infecção de *C. sublineolum* do que plantas suscetíveis, controlando a colonização do fungo (Basavaraju et al., 2009).

Os resultados de nosso estudo sugerem que a resistência não afeta a atividade de GLU nos intervalos de tempo estudados e que o pico da atividade da enzima ocorreu às 24 h.a.i. (Figura 4B), ou mesmo mais cedo. Alguns estudos em macieira têm mostrado que a atividade máxima da GLU relacionadas com outros patossistemas pode ocorrer entre intervalos de tempo que não foram analisados em nosso trabalho (inferior a 24 h.a.i. ou superior a 72 h.a.i.) (Brisset et al., 2000; El Ghaouth et al., 2002). Em outras espécies de plantas inoculadas com *Colletotrichum* spp. tem se detectado maior acúmulo de GLU em intervalos superiores a 72 h.a.i. (Zhu et al., 2008; Nantawanit et al., 2010). No entanto, não se pode descartar a possibilidade de que o pico da GLU possa ter ocorrido antes das 24 h.a.i. nas plantas do genótipo resistente. Proteínas PR como as GLU, possuem função imediata na defesa de plantas, com ação direta sobre as hifas invasoras (Van Loon et al., 2006). Além disso, deve-se levar em conta que os mecanismos de defesa são dependentes do genótipo (Métraux 2001; Kiraly et al., 2007). Por exemplo, Borsato et al. (2010) observaram um aumento significativo na atividade de GLU em plantas moderadamente suscetíveis tratadas com ulvana, mas não naquelas resistentes à ferrugem. Em suma, os padrões dos eventos iniciais do processo infeccioso da MFG foram os mesmos em folhas de macieira de genótipo suscetível ou resistente. Já um aumento da atividade de POD foi associado à resistência cultivar-específica, o que não foi observado para a atividade de GLU, que não foi influenciada pelos genótipos.

#### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor. MJS agradece ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pela bolsa de produtividade. A Dra. Rosa Valdebenito-Sanhueza pelo fornecimento de sementes e isolado fúngico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Araujo L, Borsato LC, Valdebenito-Sanhueza RM, Stadnik MJ (2008) Fosfato de potássio e ulvana no controle da mancha foliar da gala em macieira. *Tropical Plant Pathology* 33:74-80.

Asthir B, Preet K, Batta SK, Sharma B (2009) Role of antioxidative enzymes in red rot resistance in sugarcane. *Sugar Technology* 11:282-287.

Basavaraju P, Shetty NP, Shetty HS, Neergaard E, Jørgensen HJL (2009) Infection biology and defence responses in sorghum against *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Applied Microbiology* 107:404-415.

Becker WF, Katsurayama Y, Boneti JIS (2000) Mancha foliar da gala: principal doença de verão da cultura da macieira. *Agropecuária Catarinense* 13:14-20.

Bentes JLS, Matsuoka K (2002) Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* e *Paullinia cupana* var. *sorbilis* em clones resistente e suscetível. *Fitopatologia Brasileira* 27:71-77.

Borsato LC, Di Piero RM, Stadnik MJ (2010) Mecanismos de defesa eliciados por ulvana contra *Uromyces appendiculatus* em três cultivares de feijoeiro. *Tropical Plant Pathology* 35:318-322.

Bradford MMA (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.

Brisset MN, Cesbron S, Thomson SV, Paulin JP (2000) Acibenzolar-S-methyl induces the accumulation of defense-related enzymes in apple and protects from fire blight. *European Journal of Plant Pathology* 106:529-536.

Crusius LU, Forcelini CA, Sanhueza RMV, Fernandes JMC (2002) Epidemiology of apple leaf spot. *Fitopatologia Brasileira* 27:65-70.

Daykin ME, Milhollan RD (1984) Histopathology of ripe rot caused by *Colletotrichum gloeosporioides* on muscadine grape. *Phytopathology* 74:1339-1341.

Dantas ACM, Silva MF, Nodari RO (2009) Avanços genéticos da macieira no controle de doenças In: Stadnik MJ (Ed.) Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis SC. Universidade Federal de Santa Catarina. pp. 127-152.

Deising HB, Werner S, Wernitz M (2000) The role of fungal appressoria in plant infection. *Review Microbes and Infection* 2:1631-1641.

El Ghaouth A, Wilson CL, Wisniewski M (2002) Control of postharvest decay of apple fruit with *Candida saitoana* and induction of defense responses. *Phytopathology* 93:344-348.

Furlan CRC, Dantas ACM, Denardi F, Becker WF, Mantovani A (2010) Resistência genética dos acessos do banco de germoplasma de macieira da Epagri à mancha foliar de Glomerella (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Revista Brasileira de Fruticultura* 32:507-514.

Gomes S, Prieto P, Martins-Lopes P, Carvalho T, Martin A, Guedes-Pinto H (2008) Development of *Colletotrichum acutatum* on tolerant and susceptible *Olea europaea* L. cultivars: A microscopic analysis. *Mycopathologia* 168:203-211.

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

Hammerschmidt R, Kuc J (1982) Lignification as mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiological Plant Pathology* 20:61-71.

Hassan MAE, Buchenauer H (2007) Induction of resistance

- to fire blight in apple by acibenzolar-S-methyl and DL-3-aminobutyric acid. *Journal of Plant Diseases and Protection* 114:151-158.
- Hegedus A (2006) Review of the self-incompatibility in apple (*Malus × domestica* Borkh., syn.: *Malus pumila* Mill.). *International Journal of Horticultural Science* 12:31-36.
- Ishikawa FH, Barcelos QL, Alves E, Camargo OAJ, Souza EA (2010) Symptoms and prepenetration events associated with the infection of common bean by the anamorph and teleomorph of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. *Journal of Phytopathology* 158:270-277.
- Kim KD, Oh BJ, Yang J (1999) Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. *Phytoparasitica* 27:97-106.
- Király L, Barna B, Király Z (2007) Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of and acquired resistance. *Journal of Phytopathology* 155:385-396.
- Liu G, Kennedy R, Greenshields DL, Peng G, Forseille L, Selvaraj G, Wei Y (2007) Detached and attached arabidopsis leaf assays reveal distinctive defense responses against hemibiotrophic *Colletotrichum* spp. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 20:1308-1319.
- Mendgen K, Hahn M, Deising H (1996) Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology* 34:364-386.
- Métraux JP (2001) Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge. *European Journal of Plant Pathology* 107:13-18.
- Mlícková K, Luhová L, Lebeda A, Mieslerová B, Pec P (2004) Reactive oxygen species generation and peroxidase activity during *Oidium neolycopersici* infection on *Lycopersicon* species. *Plant Physiology and Biochemistry* 42:753-761.
- Morin L, Derby JAL, Kokko EG (1996) Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* on malvaceae weeds. *Mycological Research* 100:165-172.
- Munaut F, Maraite H (1998) Conidium germination and appressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guianensis*. *Phytopathology* 146:19-26.
- Nantawanit N, Chanchaichaovivat A, Panijpan B, Ruenwongsa P (2010) Induction of defense response against *Colletotrichum capsici* in chili fruit by the yeast *Pichia guilliermondii* strain R13. *Biological Control* 52:145-152.
- Peres NA, Timmer LW, Adaskaveg JE, Correll JC (2005) Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*. *Review of Plant Disease* 89:784-796.
- Stadnik MJ, Buchenauer H (2000) Inhibition of phenylalanine ammonia-lyase suppresses the resistance induced by benzothiadiazole in wheat to *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57:25-34.
- Stadnik MJ, Araújo L, Valdebenito-Sanhueza RM (2009) Estratégias alternativas de controle da mancha foliar de glomerella e da sarna da macieira. In: Stadnik MJ (Ed.) Manejo integrado de doenças da macieira. Florianópolis SC. Universidade Federal de Santa Catarina. pp. 105-126.
- Shen S, Goodwin PH, Hsiang T (2001) Infection of *Nicotiana* species by the anthracnose fungus, *Colletotrichum orbiculare*. *European Journal of Plant Pathology* 107: 767-773.
- Van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology* 44:135-162.
- Wharton PS, Julian AM, O'Connell RJ (2001) Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology* 91:149-158.
- Wharton PS, Diéguez-Urbeondo J (2004) The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61:3-22.
- Wirth SJ, Wolf GA (1996) Soluble, dye-labeled substrates for a micro-plate assay of proteinase activity. *Journal of Microbiological Methods* 25:337-342.
- Zhu X, Cao J, Wang Q, Jiang W (2008) Postharvest infiltration of bth reduces infection of mango fruits (*Mangifera indica* L. cv. Tainong) by *Colletotrichum gloeosporioides* and enhances resistance inducing compounds. *Phytopathology* 156:68-74.