



**Universidade
Estadual de Londrina**

EDNEIA APARECIDA DE SOUZA-PACCOLA

**BIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE *Colletotrichum
sublineolum* EM SORGO**

Londrina

2006

EDNEIA APARECIDA DE SOUZA-PACCOLA

**BIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE *Colletotrichum*
sublineolum EM SORGO**

**Tese apresentada ao Curso de Pós-
graduação em Agronomia da
Universidade Estadual de Londrina,
como requisito à obtenção do título de
doutor em Agronomia**

**Orientadora: Dr^a. Luzia Doretto
Paccola-Meirelles**

**Londrina
2006**

COMISSÃO EXAMINADORA

MEMBROS TITULARES

Prof. Dra. **Luzia Doretto Paccola-Meirelles** (UEL/CCB)

Prof. Dr. **Nelson Sidnei Massola Júnior** (ESALQ/USP)

Prof. Dr. **Dauri José Tessman** (UEM)

Dr. **Álvaro Manuel Rodrigues Almeida** (EMBRAPA Soja)

Dra. **Claudine Dinali Santos Seixas** (EMBRAPA Soja)

MEMBROS SUPLENTE

Dr. **Rui Pereira Leite Júnior** (IAPAR)

Prof^a. Dr^a. **Débora Cristina Santiago** (UEL)

Londrina, 21 de Fevereiro de 2006.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Pedro Alexandrino de Souza** e **Maria Aparecida de Souza**, os grandes responsáveis pela minha formação.

Ao companheiro, **Carlos Antônio Paccola**, amigo e aliado constante, pela paciência, apoio, incentivo e amor, especialmente nos momentos difíceis.

Dedico-lhes este trabalho, em nome de tudo o que significam para mim, agradecendo-lhes pelo amor, confiança e apoio de sempre.

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, que se fez sempre presente, e que me permitiu chegar até aqui para desfrutar de tão especial e único momento. A todos aqueles que com auxílio, presença e apoio me ajudaram a concluir esta tese, quer seja com sua valiosa colaboração, quer seja com palavras de apoio, ou mesmo com sua presença amiga e descontraída.

Agradecimentos especiais:

À prof^a. Dr^a. **Luzia Doretto Paccola-Meirelles**, que conduziu a orientação desta tese com seriedade e competência exemplares. Agradeço-lhe sobretudo pela participação ativa em todas as etapas, pela amizade, apoio, confiança e incentivo;

Aos Drs. **Nelson Sidnei Massola Júnior** e **Elliot W. Kitajima**, que gentilmente me receberam em seus laboratórios da ESALQ/USP para a realização dos experimentos, pelas sugestões e incentivo;

Ao Dr. **Carlos Roberto Casela**, que gentilmente me recebeu em seu laboratório na EMBRAPA Milho e Sorgo, para realização de parte dos experimentos, pelas sugestões e interesse pelo nosso trabalho;

À Prof^a. Dr. **Suzana de Fátima Paccola-Mesquita** (UEL), pelas sugestões e pela presença amiga;

Aos Drs. **Francisco Tanaka** e **Paulo Tarso**, pela paciência e valiosas dicas no manuseio das amostras e do microscópio eletrônico de transmissão e de varredura;

Ao técnico **Ideval** (UEL), **Clóvis** (EMBRAPA Milho e Sorgo) e **Renato** (ESALQ/USP), pelas valiosas dicas e prestatividade;

À amiga **Cleide A. Bomfeti** e **Léia C. L. Fávaro**, pela amizade, pela “força”, pelos momentos de descontração e divertido companheirismo e aos amigos do laboratório **Maria Eugênia, Viviane, Gabriela, Maria Paula, Philip, Daiana, Roberto, Kátia, Ana Paula, Júnior, Manuela, Alexei**. A vocês, minha gratidão pela torcida, pelo apoio e pelo carinho de sempre;

À minha irmã **Edna A. Souza-Mendonça**, pelo carinho e apoio sempre presentes;

A todos os **professores** que contribuíram para minha formação profissional;

À **Universidade Estadual de Londrina**, por fornecer estrutura e condições para a realização dos experimentos;

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

BIOLOGIA E HISTOPATOLOGIA DE *Colletotrichum sublineolum* EM SORGO

RESUMO GERAL

A antracnose causada por *Colletotrichum sublineolum* é a mais importante doença da cultura do sorgo (*Sorghum bicolor*). Resultados da literatura relatam que este fungo apresenta dimorfismo conidial quando cultivado em meio sintético. Em meio sólido são produzidos conídios falcados e em meio líquido, os conídios ovais. Por serem escassas as informações sobre a biologia dos conídios ovais, este trabalho objetivou em um primeiro momento, estudar os estádios de desenvolvimento de conídios falcados e ovais de *C. sublineolum* sobre superfícies artificiais através da microscopia de luz e em folhas de sorgo através da microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. E no segundo momento examinar o processo de infecção tanto do conídio falcado quanto do oval de *C. sublineolum* sobre cultivares de sorgo, a fim de determinar a diferença no processo de infecção entre os dois conídios e a reação dos cultivares frente à colonização dos dois tipos de conídios. Em superfícies artificiais, á semelhança dos conídios falcados, os conídios ovais se aderem, germinam e formam estruturas de infecção. A partir da germinação de conídios falcados sobre estas superfícies, são formadas hifas espessas altamente vacuoladas e em suas regiões apicais e laterais, dão origem aos conídios ovais. Conídios ovais quando inoculados sobre folhas de sorgo germinam e com 24h formam apressório, caracterizando o processo de adesão deste conídio. Acérvulos com setas contendo conídios falcados envoltos por mucilagem foram formados a partir da infecção de conídios ovais sobre a superfície foliar, caracterizando o processo infectivo deste conídio. Conídios ovais apresentam semelhanças nos eventos de pré-penetração e penetração com os conídios falcados de *C. sublineolum*, no entanto no processo de infecção, os conídios falcados produzem hifas de penetração em proporção superior aos conídios ovais. Vesículas de infecção são formadas nas células epidérmicas do hospedeiro, abaixo tanto dos apressórios oriundos da germinação de conídio falcado como oval. Conídios ovais mostraram-se infectivos e capazes de desenvolver uma série de estruturas de infecção, como por exemplo, tubo germinativo, apressório, poro de penetração, vesículas de infecção, hifas primárias e hifas secundárias, completando assim o ciclo da doença. Porém é de extrema importância investigações mais precisas para esclarecer o verdadeiro papel biológico destes conídios no processo de estabelecimento e disseminação da doença.

BIOLOGY AND HISTOPATHOLOGY OF *Colletotrichum sublineolum* IN SORGHUM

OVERALL ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum sublineolum*, is the most important disease of sorghum (*Sorghum bicolor*). Results in the literature report that this fungus exhibits conidial dimorphism when grown in synthetic media. Falcate conidia are produced in solid media whereas oval conidia are produced in liquid media. Because information on the biology of oval conidia is scarce, this research aimed to initially study the stages of development of falcate and oval conidia of *C. sublineolum* on artificial surfaces through light microscopy and in sorghum leaves through scanning and transmission electron microscopy. And, further on, to examine the infection process of falcate, as well as oval conidia of *C. sublineolum* in sorghum cultivars, to determine the difference in the infection process between the two conidia and the reaction of the cultivars in the face of colonization by both types of conidia. On artificial surfaces, similarly to falcate conidia, oval conidia adhere, germinate and form infection structures. Highly vacuolated, thick hyphae are formed from the germination of falcate conidia on these surfaces and oval conidia are formed on the apical and lateral regions of these hyphae. Oval conidia, when inoculated on sorghum leaves, germinate and with 24 hours form the appressorium, characterizing the process of adhesion of this conidium. Acervuli with setae containing falcate conidia enveloped in mucilage were formed by the infection of oval conidia on the foliar surface, characterizing the infective process of this conidium. Oval conidia exhibit similarities to falcate conidia of *C. sublineolum* in pre-penetration and penetration events, however, in the infection process falcate conidia produce penetration hyphae in superior proportion to oval conidia. Infection vesicles are formed in the epidermal cells of the host, under the appressoria originated from the germination of either falcate or oval conidia. Oval conidia were infective and capable of developing a series of infection structures, such as the germ tube, appressorium, penetration pore, infection vesicle, primary and secondary hyphae, thus completing the disease cycle. However, more precise investigations are extremely important to clarify the true biological role that these conidia have in the establishment and dissemination of the disease.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1 Histórico, Distribuição e Importância da Antracnose	05
2.2 Ambiente e Desenvolvimento da Doença	06
2.3. Sintomas da Doença	07
2.4. Características Biológicas do Patógeno	10
2.4.1. Dimorfismo Conidial	12
2.5. Sobrevivência e Disseminação do Patógeno no Ambiente	13
2.6. Patogênese .	14
2.7. Eventos de Pré-Penetração e Penetração	15
2.8. Infecção e Colonização dos Tecidos	17
2.9. Literatura Citada	20
ARTIGO 1: Aspectos Biológicos, Ultra-Estruturais e Patogênicos do Conídio Oval de <i>Colletotrichum sublineolum</i>	
3.1. Resumo	32
3.2. Abstract	33
3.3. Introdução .	34
3.4. Material e Métodos	35
3.5. Resultados e Discussão	41
3.7. Referências Bibliográficas	56
ARTIGO 2: Morfogênese e Mecanismo de penetração de Conídios Falcados e Ovais de <i>Colletotrichum sublineolum</i>	
4.1 Resumo	59
4.2 Abstract	60
4.3. Introdução .	61
4.4. Material e Métodos	63
4.5. Resultados e Discussão	65
4.7. Referências Bibliográficas	73
ARTIGO 3: Dimorfismo Conidial em <i>Colletotrichum sublineolum</i>: Um Estudo Citológico Comparativo do Processo de Infecção	
5.1 Resumo	76
5.2 Abstract	77
5.3. Introdução	78
5.4. Material e Métodos	80
5.5. Resultados e Discussão	84
5.7. Referências Bibliográficas	103
CONCLUSÃO	108

1. INTRODUÇÃO

O sorgo é um dos principais cereais cultivados no mundo, particularmente em áreas de alta temperatura e baixa precipitação, onde atinge altas produções de grãos e de forragens.

São cultivados quatro tipos de sorgo: o granífero, o forrageiro, o sacarino e o vassoura. O sorgo granífero pode ser utilizado na alimentação humana, constituindo alimento importante para a população. É bastante empregado na forma de farinha nos países da África e Ásia. Este tipo de sorgo apresenta uma composição química semelhante à do milho, e pode substituí-lo como fonte energética em rações de bovinos, suínos e aves. Na indústria é utilizado para a produção de amido, farinha, cerveja, cera, óleo comestível. Sua farinha pode ser misturada com a do trigo para a fabricação de pães e massa.

O sorgo forrageiro é empregado na produção de feno, silagem e pastejo direto, possuindo elevado potencial produtivo e de adaptação a regiões mais secas.

O sorgo sacarino pode ser utilizado na produção de xarope, que substitui o açúcar como adoçante em indústrias, podendo ser empregado também na produção de álcool a partir dos açúcares diretamente fermentáveis existentes no colmo.

O sorgo vassoura apresenta porte alto, com colmos geralmente finos e panículas com características especiais, que as tornam adaptadas ao fabrico de vassouras e escovas.

Pela ampla faixa de ambiente em que é cultivado, o sorgo apresenta-se vulnerável a um grande número de doenças. A mais importante entre elas é a antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum*, encontra-se disseminada nas principais regiões produtoras do país, constituindo fator limitante ao desenvolvimento dessa cultura, por ocasionar altas perdas na produção de grãos e forragens.

São reconhecidas três fases da doença: a antracnose foliar, a fase da podridão do colmo e a antracnose da panícula e dos grãos, sendo a fase foliar, a mais destrutiva, normalmente observada a partir de 30 a 40 dias após a emergência.

O emprego de cultivares resistente é o método mais eficiente de controle da antracnose. Entretanto, essa medida é dificultada pela variabilidade apresentada por *C. sublineolum*, a qual determina rápida adaptação deste patógeno aos cultivares resistentes em uso.

Colletotrichum sublineolum na sua forma assexuada forma conídios falciformes, conhecidos como conídios falcados, os quais são produzidos em acérvulos de cor marrom-escuros no tecido do hospedeiro ou em meio-ágar. Os estromas medem de 70-300 µm de diâmetro e são providos de setas escuras, septadas com 100 µm de comprimento. Os conidióforos produzidos nos acérvulos são eretos, hialinos, não-septados e curtos, medindo 1,6-3,3 x 4,9-13,3 µm, liberando conídios terminalmente entre as setas. Os conídios com dimensão de 4,9-5,2 x 26,1-30,8 µm são hialinos, não septados, cilíndricos e obclavéos, sendo que a sua germinação ocorre em qualquer área do conídio.

Um tipo de dimorfismo conídial foi anteriormente descrito neste fungo quando cultivado em meio de cultura sólido e líquido. Em meio sólido conídios falcados são produzidos, enquanto que em meio líquido os conídios ovais.

Diante destas considerações e por serem escassas as informações sobre o verdadeiro papel dos conídios ovais e a importância destes na relação patógeno-hospedeiro, estas observações nos levaram a estudar os estádios de desenvolvimento e o processo de infecção de conídio falcado e oval de *C. sublineolum* através da microscopia de luz, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica varredura. A tese é apresentada na forma de artigos científicos, a saber:

Artigo 1: **ASPECTOS BIOLÓGICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E PATOGÊNICOS DO
CONÍDIO OVAL DE *Colletotrichum sublineolum***

Artigo 2: **MORFOGÊNESE E MECANISMO DE PENETRAÇÃO DE CONÍDIOS
FALCADOS E OVAIS DE *Colletotrichum sublineolum***

Artigo 3. **DIMORFISMO CONIDIAL EM *Colletotrichum sublineolum*: UM ESTUDO
CITOLÓGICO COMPARATIVO DO PROCESSO DE INFECÇÃO.**

2. REVISÃO DE LITERATURA

O sorgo [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] é uma planta nativa da África Central, da região da Etiópia e Sudão, de onde propagou se por todo o continente africano e asiático, atingindo, posteriormente, a América e a Austrália (Frederiksen, 1986). Trata-se de um importante cereal cultivado no mundo, principalmente nas áreas de alta temperatura e baixa precipitação, onde atinge elevada produção de grãos e de forragem (Leslie e Frederiksen, 1995). A produção mundial de sorgo, no ano de 2001, foi de aproximadamente 58 milhões de toneladas, correspondendo a uma área colhida de cerca de 42 milhões de hectares (FAO, 2002). A produção no Brasil, apesar de contribuir com apenas cerca de 1,54 % da produção mundial, tem apresentado aumentos significativos de produção nos últimos anos, passando de 356.467 toneladas no ano de 1996, para 895.331 toneladas no ano de 2001 (FAO, 2002).

No Brasil, a cultura do sorgo ocorre em regiões ecologicamente distintas e com diferentes sistemas de produção. Na região Sul, especialmente no Rio Grande do Sul, o déficit hídrico acentuado na região de Bagé proporcionou o estabelecimento e a expansão da cultura. Na região Nordeste, o sorgo sempre foi apontado como opção para cultivo, por apresentar maior tolerância ao déficit hídrico. Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, o sorgo é cultivado em monocultivo em plantios de verão, principalmente em sucessão com a soja (Pitta, 1991; Waquil, 1992; Duarte, 1994).

Pela ampla faixa de condições ambientais em que é cultivado, o sorgo apresenta-se particularmente suscetível a um grande número de doenças, cuja extensão e severidade variam de ano para ano e de uma localidade para outra em função do grau de compatibilidade entre o hospedeiro e o patógeno e da ação do ambiente sobre essa associação.

Atualmente, a antracnose, doença causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* Henn. [as “*sublineola*”], em Kabát & Bubát é considerada a principal doença do sorgo e encontra-se disseminada em todas as regiões produtoras, constituindo fator limitante ao desenvolvimento da cultura, por ocasionar grandes perdas de produção de grãos e de forragens (Guimarães *et al.*, 1999). Perdas superiores a 50% na produção de grãos, têm sido relatadas, sob condições de epidemias severas, principalmente quando há alternância de condições secas e úmidas associadas a temperaturas elevadas (Casela *et al.*, 1997).

2. 1. HISTÓRICO, DISTRIBUIÇÃO E IMPORTÂNCIA DA ANTRACNOSE

A antracnose do sorgo foi descrita pela primeira vez em Togo, Oeste da África, em 1902 (Pande *et al.*, 1991). Posteriormente, detectada no Texas, Estados Unidos da América (EUA), no ano de 1912 (Casela *et al.*, 1997). Atualmente a doença encontra-se presente em, praticamente, todas as regiões produtoras de sorgo no mundo, sendo predominante em regiões de clima quente e úmido envolvendo os trópicos semi-áridos, úmido e regiões de clima temperado com temperaturas elevadas no período do verão (Ali e Warren, 1987; Pande *et al.*, 1991; Pande *et al.*, 1994) incluindo a África, Ásia e as Américas (Frederiksen, 1986).

Perdas na produção de grãos têm sido relatadas em diversos locais onde o sorgo é cultivado, como por exemplo, nos EUA onde perdas superiores a 50% foram constatadas em cultivares suscetíveis durante severas epidemias da doença (Harris e Johnson, 1967), Porto Rico, onde as perdas foram superiores a 70% (Powell *et al.*, 1977), na Índia, com perdas de até 16,4% (Mishra e Siradhama, 1979), na Nigéria, onde são relatadas perdas em torno de 45% (Neya e Kabore, 1987), e no Oeste da África, onde há relatos de perdas acima de 50% (Thomas *et al.*,

1995). Segundo Powell *et al.*, (1977), as reduções na produção devido à antracnose, resultaram de incompleto enchimento de grãos, como demonstrado por reduções no peso e na densidade de sementes por panícula.

No Brasil, a antracnose do sorgo foi relatada pela primeira vez no estado de São Paulo, em 1934 (Panizzi e Fernandes, 1997) e atualmente está presente em todas as áreas produtoras (Casela *et al.*, 2001). Reduções superiores a de 80% na produção de grãos têm sido constatadas em cultivares suscetíveis, em anos e locais favoráveis ao desenvolvimento e disseminação da doença (Panizzi e Fernandes, 1997).

2. 2. AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

Epidemias de antracnose do sorgo são favorecidas por condições de alta precipitação e umidade relativa, temperatura moderada e grande quantidade de inóculo (Frederiksen, 2000). Segundo Pande *et al.* (1994), o máximo desenvolvimento da doença foi observado em temperaturas em torno de 25° C, enquanto temperaturas abaixo de 15° C e acima de 30° C restringiram seu desenvolvimento. Segundo os mesmos autores, um período mínimo de 24 h de molhamento foliar é necessário para iniciar o processo de infecção pelo fungo cuja severidade aumenta com o aumento do período de molhamento foliar.

2.3. SINTOMAS DA DOENÇA

São reconhecidas três fases da doença: a antracnose foliar, a podridão do colmo e a antracnose da panícula e dos grãos (Thakur e Mathur, 2000). A fase foliar da antracnose (Figura 1A – 1B) é mais prevalente a partir do desenvolvimento da panícula, podendo entretanto ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta. Nesta fase os sintomas iniciais são caracterizados por pequenas lesões elípticas a circulares, com diâmetro em torno de 5 mm. Com a evolução das lesões, elas passam a apresentar centros necróticos de coloração palha, com margens avermelhadas, alaranjadas ou castanhas, variando em função da pigmentação da cultivar. No centro das lesões há formação, em quantidade variável, de acérvulos, a frutificação típica do patógeno, que constituem a principal forma de identificação da doença em condições de campo. A coalescência é observada principalmente sob condições de alta umidade, quando grande parte do limbo foliar apresenta-se tomado por lesões, no centro das quais há formação de grande quantidade de acérvulos (Warren, 1986).

A infecção na nervura central da folha (Figura 1A) ocorre de maneira independente da infecção foliar (Thakur e Mathur, 2000). Nesse caso, os sintomas são caracterizados por lesões elípticas a alongadas, de coloração avermelhada, púrpura ou escura, nas quais podem ser observados os acérvulos do patógeno. A fase de podridão do colmo ocorre principalmente a partir da maturação das plantas e, normalmente, é causada por conídios produzidos na fase foliar da doença. Os sintomas caracterizam-se pela formação de cancos, com áreas mais claras circundadas por áreas com pigmentação característica da planta hospedeira. As lesões ocorrem no tecido internodal, principalmente no pedúnculo, podendo apresentar-se de forma contínua ou na forma de manchas isoladas. Quando o colmo é seccionado

longitudinalmente, observa-se uma coloração avermelhada a escura, equivalente à necrose do tecido vascular (Warren, 1986; Casela e Ferreira, 1998).

A infecção da panícula (Figura 1C) pode ser uma extensão da fase de podridão do colmo. Os sintomas caracterizam-se pela presença, abaixo da epiderme, de lesões que têm, inicialmente, um aspecto encharcado, adquirindo, mais tarde, uma coloração cinza a púrpura – avermelhada. Se o pedúnculo é seccionado longitudinalmente, verifica-se uma coloração castanho–avermelhada, alternada com áreas de tecido esbranquiçado. Panículas de plantas infectadas normalmente são menores e amadurecem mais cedo (Warren, 1986). A antracnose da panícula e dos grãos tem como inóculo, conídios produzidos durante a fase foliar da doença, os quais são levados à bainha das folhas pela água da chuva, germinam e penetram o pedúnculo ou a panícula, causando a podridão no interior do colmo (Figura 1D) (Guimarães, 1996; Casela e Ferreira, 1998). A esporulação ocorre na ráquis central, estendendo-se para as demais ramificações, glumas e sementes. Desse modo, a antracnose prejudica não só o desenvolvimento da planta, mas também causa esterilidade parcial e redução da produção (Warren, 1986; Thakur e Mathur, 2000).

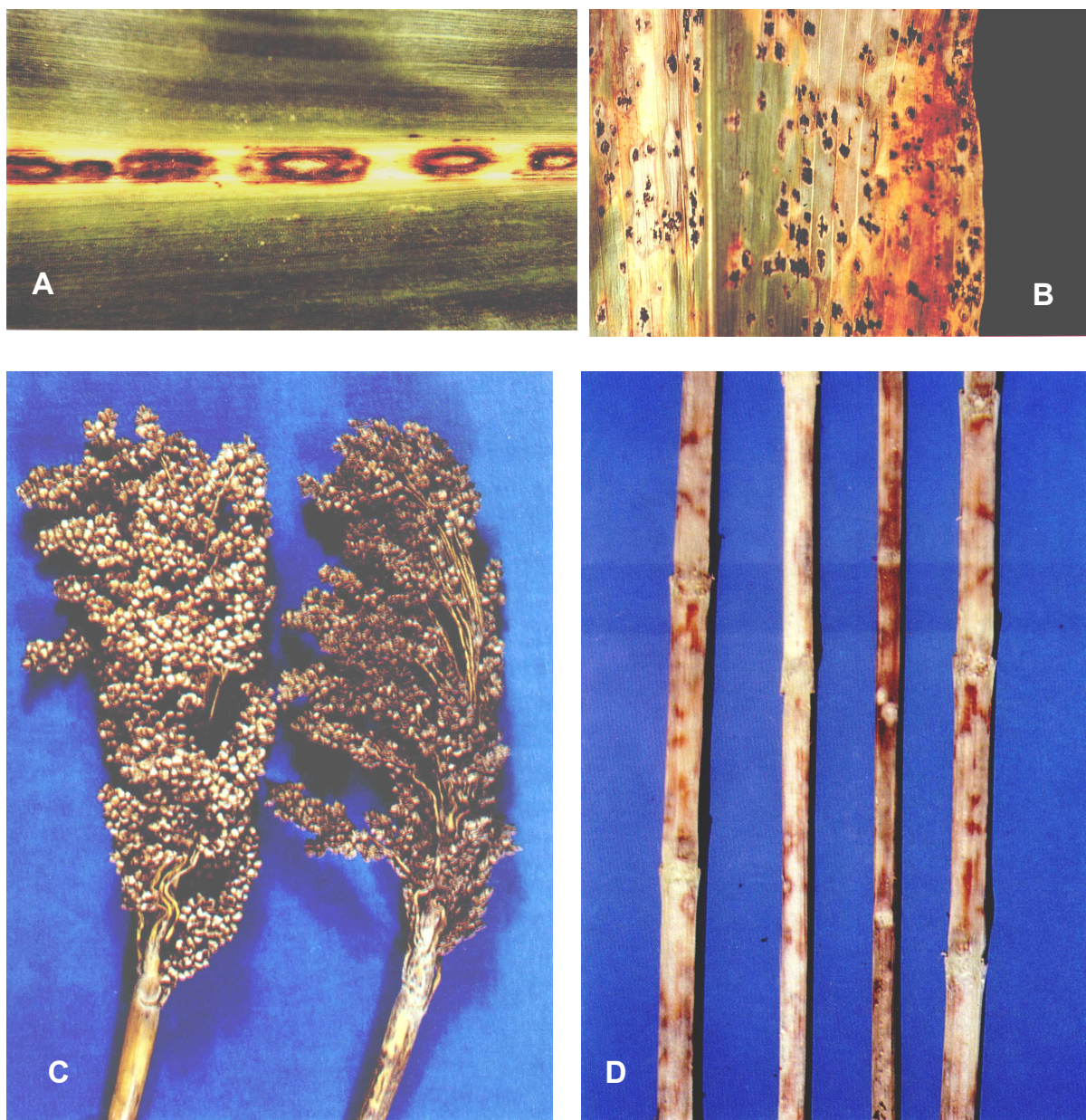


Figura 1. Sintomas da doença causada por *Colletotrichum sublineolum* em sorgo. (A) Infecção da nervura central da folha caracterizada pela presença de lesões elípticas a alongadas, de coloração avermelhada, púrpura ou negra. (B) Infecção das folhas caracterizada pela produção de lesões elípticas a circulares de coloração palha, com margens avermelhadas, alaranjadas, púrpura-escuras ou castanhas. (C) Panícula de sorgo com sintomas de antracnose ao lado de uma panícula sadia. A infecção da panícula é caracterizada por lesões formadas abaixo da epiderme, que tem, inicialmente, um aspecto encharcado, adquirindo mais tarde, uma coloração cinza a púrpura-avermelhada. (D) Podridão de antracnose em colmos de sorgo, caracterizada pela formação de cancos, os quais apresentam áreas mais claras circundadas pela pigmentação característica da planta. (Fotos: Casela e Ferreira, 1998)

2.4. BIOLOGIA DO PATÓGENO

A antracnose do sorgo é causada pelo fungo *Colletotrichum graminicola* (Ces) G. W. Wilson, correspondente à forma teleomórfica *Glomerella graminicola* Politis. A espécie *C. graminicola* pertence à ordem Melanconiales, que inclui fungos assexuados que produzem conídios em estruturas reprodutivas (conidiomas) denominadas acérvulos. *Colletotrichum graminicola* foi descrito pela primeira vez em plantas de milho (*Zea mays* L.), na Itália, por Cesati em 1852, com o nome de *Dicladium graminicolum* Ces. Posteriormente o fungo foi constatado nos Estados Unidos no ano de 1855, e descrito sob o nome de *Psilonia apalospora* Berk & Curt (Sutton, 1980). Wilson (1914) incluiu 11 espécies que apresentavam conídios falciformes à sinonímia *C. graminicola*. Outras espécies como *C. cereale* Manns e *C. lineola* Corda, foram incluídas nesse amplo conceito de *C. graminicola*, com exceção da espécie *Colletotrichum falcatum* Went, agente causal da podridão vermelha da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.).

Trabalhos envolvendo isolados de *C. graminicola* provenientes de milho e sorgo, têm demonstrado uma estreita especificidade de hospedeiro (Jamil e Nicholson, 1987), indicando que as formas de *C. graminicola* que atacam o milho e o sorgo são distintas, podendo ser consideradas como *formae speciales* ou espécies diferentes. Mais recentemente, estudos comparando as seqüências de nucleotídeos de rDNA da região ITS-2 de *C. graminicola* proveniente de milho e de sorgo (Sherriff *et al.*, 1995), testes de cruzamento, análises de RFLPs de DNA mitocondrial e RAPD de isolados de *Glomerella* de milho e de sorgo (Vaillancourt e Hanau, 1992), indicaram que os isolados de milho representam uma espécie distinta daquela dos isolados de sorgo, confirmando estudos morfológicos e genéticos anteriores.

Costa *et al.* (2003) relataram a importância de se reconhecer a existência das duas espécies de *Colletotrichum*, e que apesar da semelhança morfológica entre elas, possam existir diferenças fisiológicas quanto ao modo de infecção, esporulação, gama de hospedeiros, compatibilidade genética, epidemiologia e sensibilidade a fungicidas, requerendo em certos casos, estratégias e práticas de manejo diferenciadas.

Colletotrichum graminicola à semelhança de *C. sublineolum*, apresenta micélio septado, ramificado, hialino e granular. Culturas desenvolvidas em meio de aveia-ágar produzem grande quantidade de conídios em resposta à luz a uma temperatura em torno de 25° C. Os acérvulos, as estruturas de frutificação do patógeno, apresentam coloração marrom escura, formato circular ou oval, medem de 70-300 µm e são caracterizados pela presença de setas negras e pela grande quantidade de conídios produzidos em massa de coloração rosa a creme tanto em meio de cultura como em tecido do hospedeiro. Os conidióforos são curtos, eretos, hialinos, não septados e não ramificados, medindo de 1,6-3,3 x 4,9-13,3 µm. As setas são longas e septadas, com comprimento de 100 µm e são formadas entre os conidióforos (Casela e Ferreira, 1998). Os conídios são produzidos isoladamente na extremidade dos conidióforos entre as setas e em massas imersas em um substrato gelatinoso; medem entre 4,9-5,2 x 26,1-30,8 µm, são hialinos, unicelulares e falciformes. A germinação pode ocorrer em qualquer área do conídio (Warren, 1986; Thakur e Mathur, 2000).

A forma sexual, raramente encontrada na natureza, foi obtida a partir de *C. graminicola* infectando milho e é caracterizada por peritécios rostrados e erumpentes, onde são produzidas ascas cilíndricas a clavadas apresentando poro apical por onde os ascósporos são liberados. Estes por sua vez, são hialinos, unicelulares e ligeiramente curvos, medindo cerca de 3-6 x 8-16 µm (Politis, 1975). A forma sexual de *C. sublineolum* ainda não foi relatada.

2. 4. 1. Dimorfismo Conidial

Souza-Paccola *et al.* (2003a) descreveram um segundo tipo de conídio em isolados de *C. sublineolum*, o conídio oval, quando cultivado em meio líquido, a exemplo daqueles descritos em isolados de *C. graminicola* em milho por Nishihara (1975). Segundo esse último autor, os conídios ovais apresentam-se mais virulentos que os conídios falcados quando inoculados em plântulas de milho. Panaccione *et al.* (1989) descreveram a produção destes dois tipos de conídios em *C. graminicola* tanto em cultura como em plantas infectadas. Segundo estes autores o conídio falcado é produzido blasticamente a partir de células conidiógenas morfológicamente distintas, enquanto que o conídio oval é produzido blasticamente a partir de hifas que faltam as células conidiógenas diferenciadas. O conídio oval de *C. sublineolum* apresenta-se com forma oval a elíptica, de tamanho variado, porém menor que o falcado (Souza-Paccola *et al.*, 2003a) à semelhança do conídio oval de *C. graminicola* (Panaccione *et al.*, 1989). Yang *et al.* (1991), observaram que a luz branca induz a expressão do gene responsável pela formação dos conídios ovais a partir de hifas de *C. graminicola*.

Segundo Souza-Paccola *et al.* (2003a) os conídios ovais representam uma alternativa importante para estudos de natureza genética e para testes de patogenicidade, principalmente em linhagens que dificilmente esporulam em meios sintéticos. Estes autores utilizando conídios ovais, provenientes de linhagens mutantes de *C. sublineolum* não produtoras de conídios falcados, descreveram a anastomose de hifas seguida de paramiose (Souza-Paccola *et al.*, 2003b) como mecanismos geradores de variabilidade genética na espécie, sendo responsáveis em parte pelo aparecimento de novas raças fisiológicas.

Fávaro (2004) descreve elementos genéticos transponíveis como possíveis mediadores de variabilidade genética em *C. sublineolum*.

2. 5. SOBREVIVÊNCIA E DISSEMINAÇÃO DO PATÓGENO NO AMBIENTE

Conídios ou micélio do patógeno podem sobreviver por até 18 meses na ausência do hospedeiro, em restos culturais na superfície do solo, mas não sobrevivem quando restos culturais são incorporados ao solo (Warren, 1986; Casela e Ferreira, 1998; Thakur e Mathur, 2000). O fungo pode também sobreviver em espécies selvagens de sorgo, como *S. halepense* (L.) Persoon, *S. verticilliflorum* (Steud.) Stapf., *S. arundinaceum* (Desv.) Stapf., e ainda como micélio e conídios em sementes infetadas. Nos acérvulos há produção de uma mucilagem que protege os conídios da dessecação e da ação de compostos fenólicos produzidos pela planta, os quais impedem a sua germinação (Ngugi *et al.*, 2000).

Abundante produção de microesclerócios pode ser observada em colmos secos de cultivares sensíveis, ao final o ciclo da cultura. Estas estruturas desempenham um importante papel como fonte primária de inóculo (Casela e Frederiksen, 1993). Os microesclerócios são esporogênicos sendo sua sobrevivência maior em restos culturais mantidos na superfície do solo. A mais rápida degradação dos restos culturais abaixo da superfície do solo contribui para a colonização dos microesclerócios por microorganismos presentes na microflora do solo (Casela e Frederiksen, 1993).

A disseminação através dos conídios ocorre principalmente através de respingos de chuva, e em menor proporção, através do vento. Em condições de campo, a

dispersão dos conídios em respingos de água no sentido vertical, pode atingir distâncias de até 75 cm da fonte de inóculo, enquanto a dispersão lateral pode atingir até 1 m (Nicholson e Moraes, 1980; Ngugi *et al.*, 2000). Pande *et al.* (1994) estudaram a distância e a direção da dispersão de conídios de *C. graminicola* a distâncias crescentes de 0,75 m a partir da fonte de inóculo, durante o período chuvoso de 1985, no sul da Índia. Segundo os autores, dentro de sete dias foram observados sintomas da doença na fonte de inóculo, a 3,5 m da fonte na fase de 13-14 folhas, e a 9,75 m na fase de maturação. A disseminação de *C. graminicola* a longa distância se dá principalmente através de sementes contaminadas (Cardwell *et al.*, 1989).

2. 6. PATOGÊNESE

O conhecimento do processo de infecção das espécies de *Colletotrichum* em seus hospedeiros, assim como os fatores que influenciam tais processos são um pré-requisito para o desenvolvimento de estratégias efetivas de controle, fornecendo informações para a elaboração de modelos de previsão, auxiliando na seleção e aplicação de estratégias de controle (Bailey *et al.* 1992).

Na literatura o processo de infecção e penetração do patógeno é bem estudado em isolados de *Colletotrichum graminicola* em milho. Pouco é conhecido em *C. sublineolum*, porém devido à semelhança entre esses dois patógenos, o processo é descrito com base nas descrições feitas em *C. graminicola* e em outras espécies de *Colletotrichum*.

2. 7. EVENTOS DE PRÉ-PENETRAÇÃO E PENETRAÇÃO

Infecção típica de *Colletotrichum* envolve uma seqüência comum de eventos. Inicialmente tem-se a adesão dos conídios ou ascósporos dispersos sobre a planta, sendo este um processo passivo e inespecífico (Bailey *et al.*, 1992; Lopez, 2001). Logo após a deposição na superfície foliar, os conídios de *C. graminicola*, em contato com um filme de água na superfície da folha, iniciam o processo de germinação. Segundo Wharton e Julian (1996), a maioria dos esporos germina dentro de um período de nove horas. Tanto conídios quanto ascósporos emitem tubos germinativos indiferenciados ou podem passar por uma diferenciação complexa na sua extremidade livre formando um apressório globoso (Parbery, 1981) próximo ao conídio, normalmente na junção entre células epidérmicas. Apressórios são considerados essenciais à infecção e apresentam morfologia característica dentro do gênero, podendo ser globosos e de contorno regular ou com variados graus e freqüência de rugosidades (Sutton, 1992). Materiais exógenos como grãos de pólen, ácidos orgânicos e sideróforos, podem influenciar a germinação do conídio e sua diferenciação em apressórios. Na presença de nutrientes, o índice de germinação conidial é acentuado, porém, baixas concentrações freqüentemente inibem a formação de apressórios (Mercer *et al.*, 1971, Bailey *et al.*, 1992, Skipp *et al.*, 1995).

No gênero *Colletotrichum*, a germinação é altamente influenciada por temperatura e umidade. Espécies de *Colletotrichum* em *Citrus* spp., que causam queda de frutos jovens, têm acentuada germinação de seus conídios sob condições de temperatura acima de 25°C e umidade atmosférica em torno de 80%. Neste patossistema, a incidência da doença aumenta quando ocorre aumento da precipitação pluviométrica seguida de um prolongado período de umidade atmosférica alta (Denham e Waller, 1981).

A topografia da superfície do hospedeiro é relatada também afetando a formação de apressórios (Lapp e Skoropad, 1978). Em *C. orbiculare*, é necessário que o tubo germinativo alcance junções das células antes da formação de apressórios (Anderson e Walker, 1962). Segundo Lapp e Skoropad (1978), a formação de apressórios em *C. graminicola* é dependente da estrutura física da superfície foliar, havendo maior formação de apressórios nas suas depressões.

A partir da fixação do apressório na superfície da folha, há formação da hifa infetiva, a qual emerge a partir do poro do apressório iniciando o processo de penetração. Há várias possibilidades de penetração: diretamente pela cutícula e parede celular do hospedeiro (Wharton *et al.*, 2001), por aberturas naturais, tais como estômatos ou, por ferimentos. O modo mais comum de penetração é diretamente pela cutícula da planta, havendo, entretanto, casos em que ferimentos são essenciais, tais como podridão da coroa e do pedicelo em banana (*Musa* sp.), causados por *C. musae* (Krantz *et al.*, 1978) e podridão em mandioca, causada por *C. gloeosporioides* (Van der Bruggen e Maraite, 1987; Van der Bruggen *et al.*, 1990).

Para a maioria das espécies de *Colletotrichum*, especialmente aquelas que atacam tecidos jovens, sua habilidade para penetrar a cutícula diretamente é de extrema importância. Três mecanismos têm sido propostos para explicar a penetração através da cutícula: a) a força mecânica; b) secreção de enzimas degradadoras da cutícula e parede celular; e c) uma combinação dos processos anteriores (Bailey *et al.*, 1992). Existem evidências de que o apressório de *C. graminicola* exerce força mecânica suficiente para penetrar através da cutícula e da parede celular da planta (Pascholati *et al.*, 1993). Segundo Soliday *et al.* (1989) há indicações da presença de enzimas de hidrólise de quitina durante os eventos de penetração.

Mercer *et al.* (1971) comprovaram que *C. lindemuthianum* exerce força suficiente para penetrar uma cutícula, fato evidenciado quando este patógeno foi capaz de romper

membranas de Formvar, insensíveis à hidrólise por enzimas fúngicas. Por outro lado, a penetração pode requerer enzimas que dissolvam ou enfraqueçam a cutícula do hospedeiro. Várias espécies de *Colletotrichum* produzem esterases capazes de degradar cutina. Mutantes de *C. gloeosporioides* deficientes na produção de cutinase não foram patogênicos a frutos de mamão intactos, entretanto, quando feridos ou superficialmente tratados com cutinase, lesões normais foram produzidas (Dickman e Patil, 1986). Similarmente, lesões não foram produzidas quando inibidores químicos de cutinase foram misturados com conídios de *C. gloeosporioides* (Dickman *et al.*, 1983). Em outro caso, em que foram isolados dois tipos de cutinases de *C. lagenarium*, a inibição de cutinase não foi capaz de afetar a patogenicidade (Bonnen e Hammerschmidt, 1989a, b), além de não haver diferença em virulência quando se inoculavam mutantes que produziam menores quantidades desta enzima.

A penetração por meio de tubo germinativo não diferenciado, ou seja, sem formação de apressório, ou através dos estômatos não foi observada. Dentro da parede celular a hifa infectiva aumenta de volume e desenvolve uma vesícula de infecção globosa (Wharton e Julian, 1996; Wharton *et al.*, 2001).

2. 8. INFECÇÃO E COLONIZAÇÃO DOS TECIDOS

Após a penetração dos tecidos da folha, *C. graminicola* inicia o processo de infecção o qual apresenta dois estádios: uma fase inicial biotrófica e uma fase secundária necrotrófica. Na fase biotrófica, a qual tem uma duração de, aproximadamente, 24 h, as membranas das células infetadas invaginam-se em torno de vesículas de infecção, não havendo qualquer alteração estrutural no citoplasma. Após a colonização dos tecidos vegetais, o patógeno altera seu comportamento para necrotrofia, alimentando-se de nutrientes que exsudam da célula.

Nesta fase, há danificação acentuada de células do hospedeiro, devido a uma série de fatores, tais como aumento do volume e decréscimo na densidade do citoplasma, aumento da fragilidade e permeabilidade da membrana plasmática, levando à sua ruptura e desorganização geral do citoplasma culminando com a morte celular (Bailey *et al.*, 1992; O'Connell, 1987; Skipp *et al.*, 1995).

Espécies de *Colletotrichum* utilizam duas estratégias de infecção: colonização subcuticular intramural e colonização intracelular (Bailey *et al.*, 1992).

Após a penetração, patógenos que possuem colonização subcuticular intramural antes de se desenvolver sob a cutícula, formam uma rede intramural de hifas que crescem inter e intracelularmente, matando as células com o seu avanço. Neste tipo de infecção o estágio biotrófico não é detectável (Bailey *et al.*, 1992; Perfect *et al.*, 1999).

A maioria das espécies de *Colletotrichum* exibe o segundo tipo de infecção, isto é, colonização intracelular, embora a extensão do estágio biotrófico seja variável ou ausente em muitas interações. Após a penetração, hifas crescem entre a membrana plasmática e a parede celular das células do hospedeiro sem a penetração no protoplasto formando uma vesícula (O'Connell, 1987; Skipp *et al.*, 1995). Estes fungos que se nutriam inicialmente de células vivas do hospedeiro, antes de trocar para necrotrofia são considerados hemibiotróficos ou biotróficos facultativos.

Após a infecção de várias células do hospedeiro, as hifas crescem intracelularmente, degenerando as células infetadas e dando origem à fase necrotrófica de infecção, quando hifas secundárias, de diâmetro variável são formadas (Wharton & Julian, 1996; Wharton *et al.*, 2001).

Esta fase necrotrófica destrutiva está associada com abundante produção de enzimas capazes de degradar paredes, matando células e liberando nutrientes suficientes para o

avanço das hifas para outros tecidos (Bailey *et al.*, 1992; O'Connell, 1987; Skipp *et al.*, 1995). Nesta fase são observados os sintomas típicos da doença. Durante a colonização dos tecidos do hospedeiro, a cutícula é rompida mecanicamente, permitindo a exteriorização dos conidióforos, conídios e setas, caracterizando a esporulação do patógeno. Eventualmente, conidióforos emergem através da cutícula do hospedeiro e formam acérvulos na superfície da planta (Bailey *et al.*, 1992).

2. 9. LITERATURA CITADA

ALI, M. E. K.; WARREN, H. L. Physiological races of *Colletotrichum graminicola* on sorghum. **Plant Disease**, v. 71, p. 402-404, 1987.

ANDERSON, J. L.; WALKER, J. C. Histology of watermelon anthracnose. **Phytopathology**, v. 52, p. 650-653, 1962.

BAILEY, J. A.; O'CONNELL, R. J.; PRING, R. J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A.; Jeger, M.J. (Eds.) ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. C.A.B. International, Wallingford, 1992. p.88-120.

BONNEN, A. M.; HAMMERSCHMIDT, R. Cutinolytic enzymes from *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35, p. 463-474, 1989a.

BONNEN, A. M.; HAMMERSCHMIDT, R. Role of cutinolytic in infection of cucumber by *Colletotrichum lagenarium*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 35, p. 475-482, 1989b.

CARDWELL, K. F.; HEPPERLY, P. R.; FREDERIKSEN, R. A. Pathotypes of *Colletotrichum graminicola* and seed transmission of sorghum anthracnose. **Plant Disease**, v. 73, p. 255-257, 1989.

CASELA, C. R.; FREDERIKSEN, R. A. Survival of *Colletotrichum graminicola* sclerotia in sorghum stalk residue. **Plant Disease**, v. 77, p. 825-827, 1993.

CASELA, C. R.; PINTO, M. F. J. DE A.; OLIVEIRA, E. DE; FERREIRA, A.S. **Sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench): controle de doenças**. Vale, F.X.R.; Zambolim, L. (Eds.) Controle de doenças de plantas Editora UFV, Viçosa-MG, 1997. p.1025-1064.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **Antracnose do sorgo (*Colletotrichum graminicola*)**. Sete Lagoas: EMBRAPA – CNPMS, 1998. 19 p. (EMBRAPA – CNPMS. Circular Técnica, 28)

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, F. G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. **Fitopatologia Brasileira**, v. 26, p. 217-219. 2001.

COSTA, R. V.; CASELA, C. R.; ZAMBOLIM, L.; FERREIRA, A. S. A antracnose em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 345-354, 2003.

DENHAM, T. G.; WALLER, J. M. Some epidemiological aspects of post-bloom fruit drop disease (*Colletotrichum gloeosporioides*) in citrus. **Annals of Applied Biology**, Warwick, v. 98, p. 65-77, 1981.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S. Cutinase deficient mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* are non-pathogenic to papaya fruit. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 28, p. 235-242, 1986.

DICKMAN, M. B.; PATIL, S. S.; KOLATTUKUDY, P. E. Effects of organophosphorus pesticides on cutinase activity and infection of papayas by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, v. 73, p. 1209-1214, 1983.

DUARTE, P. E. Situação da cultura do sorgo no Brasil. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo -1992-1993**. v. 6, p. 13-14, 1994.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. www.fao.org. 2002.

FAVARO, L. C. L. **Caracterização da instabilidade genética em *Colletotrichum sublineolum*, agente causal da antracnose em sorgo**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR.

FREDERIKSEN, R. A. **Compendium of Sorghum diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. p.82, 1986.

FREDERIKSEN, R. A. **Compendium of Sorghum diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society, 2000.

GUIMARÃES, F. B. **Resistência dilatória à antracnose (*Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wilson) do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench)**. 1996. 51 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

GUIMARÃES, F. B.; CASELA, C. R.; SANTOS, F. G.; PEREIRA, J. C. R.; FERREIRA, A. S. Avaliação da resistência de genótipos de sorgo a antracnose. **Summa Phytopathologica** 25:308-312. 1999.

JAMIL, F. F.; NICHOLSON, R. L. Susceptibility of corn to isolates of *Colletotrichum graminicola* pathogenic to other grasses. **Plant Disease**, v. 71, p. 809-810, 1987.

HARRIS, H.B.; JOHNSON, J.B. **Sorghum anthracnose symptoms, importance and resistance**. Proceedings of the Fifth Biennial Grain Sorghum Research and Utilisation

Conference, sponsored by the Grain Sorghum Producers' Association (GSPA) and Sorghum Improvement Conference of North America, p.48-52,1967.

KRANTZ, J.; SCHUMUTTERER, H.; KOCH, W. **Diseases, Pest and Weeds in Tropical Crops**. Chichester: Wiley and sons, 1978.

LAPP, M. S.; SKOROPAD, W. P. Location of appressoria of *Colletotrichum graminicola* on natural and artificial barley leaf surfaces. **Transactions of the British Mycological Society**, Cambridge, v. 70, p.225-228, 1978.

LESLIE, J. F.; FREDERIKSEN, R. A. Variable pathogens: a scenario. In: LESLIE, J. F.; FREDERIKSEN, R. A; BORLAUG, N. (eds), **Disease analysis through genetics and biotechnology**. Ames: Iowa State University. p. 3-8, 1995.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 9, p. 291-338, 2001.

MERCER, P. C.; WOOD, R. K. S.; GREENWOOD, A. D. Initial infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. In: PREECE, T. F.; DICKINSON, C. H. (Ed.). **Ecology of Leaf Surface Micro-organisms**. London: Academic Press, 1971. p. 381-389.

MISHRA, A.; SIRADHAMA, B. S. Evaluation of losses due to anthracnose of sorghum. **Indian Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 9, p. 257, 1979.

NEYA, A.; KABORE, K. B. Mesure de l'incidence de l'antracnose et de la pourriture rouge des tiges causes par le *Colletotrichum graminicola* chez le sorgho. **Phytoprotection**, v. 68, p. 121-123. 1987.

NGUGI, H. K.; JULIAN, A. M.; KING, S. B.; PEACOCKE, B. J. Epidemiology of sorghum anthracnose (*Colletotrichum sublineolum*) and leaf blight (*Exserohilum turcicum*) in Kenya. **Plant Pathology**, v. 49, p. 129-140. 2000.

NICHOLSON, R. L.; MORAES, W. B. C. Survival of *Colletotrichum graminicola*: Importance of the spore matrix. **Phytopathology**, v. 70, p. 255-261, 1980.

NISHIHARA, N. Two types of conidia of *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. formed on artificial media and their pathogenicity. **Annual Phytopathology Society Japan**, v. 41, p. 171-175, 1975.

O'CONNELL, R. J. Absence of a specialized interface between intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and cells of *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, v. 107, p. 725-734, 1987.

PANACCIONE, D. G.; VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**. v. 81, p. 875-882, 1989.

PANDE, S.; MUGHOGHO, L. K.; BANDYOPADHYAY, R.; KARUNAKAR, R. I. Variation in pathogenicity and cultural characteristics of sorghum isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. **Plant Disease**. v. 75, p. 778-783, 1991.

PANDE, S.; THAKUR, R. P.; KARUNAKAR, R. I.; BANDYOPADHYAY, R.; REDDY, B. V. S. Development of screening methods and identification of stable resistance to anthracnose in sorghum. **Field Crops Research**, v. 38, p. 157-166, 1994.

PANIZZI, R. C.; FERNANDES, N. G. Doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench). CAMARGO, E. A.; REZENDE, J. A. M. (Eds.). **Manual de Fitopatologia - Doenças das Plantas Cultivadas**. Editora Agronômica Ceres, São Paulo, 1997. v. 2, pp.676-689.

PASCOLATI, S. F.; DEISING, H.; LEITE, B.; ANDERSON, D.; NICHOLSON, R. L. Cutinase and non-specific esterase activities in the conidial mucilage of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 42, p. 37-51, 1993.

PARBERY, D. G. Biology of anthracnose on leaf surfaces. In: BLAKEMAN, J. P. (Ed.). **Microbial ecology of the phylloplane**. London: Academic Press, 1981. p. 135-154.

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

PITTA, G. V. E. Situação do programa nacional de pesquisa de sorgo. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo**, 1985-1987, v. 4, p. 103-105, 1991.

POLITIS, D. J. The identity and perfect state of *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**, v. 67, p. 56-62, 1975.

POWELL, P.; ELLIS, M.; ALAMEDA, M.; SOTOMAYOR, A. Effect of natural anthracnose epiphytotics on yield, grain quality, seed health, and seed borne fungi in *Sorghum bicolor*. **Sorghum Newsletter**, v. 20, p. 77-78, 1977.

SHERRIF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; BAILEY, J. A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, v. 99, p. 475-478, 1995.

SKIPP, R. A.; BEEVER, R. E.; SHARROCK, K. R.; RIKKERINK, E. H. A.; TEMPLETION, M. D. *Colletotrichum*. In.: KOHMOTO, K.; SINGH, U. S.; SINGH, R. P. (Ed.). **Pathogenesis and host specificity in plant diseases**. Oxford: Pergamon/Elsevier, 1995. v. 2, p. 119-142.

SOLIDAY, C. L.; DICKMAN, M. B.; KOLATTUKUDY, P. E. Structure of the cutinase gene and detection of promoter activity in the 5'- flanking region by fungal transformation. **Journal of Bacteriology**, v. 171, p. 1942-1951. 1989.

SOUZA-PACCOLA, E. A.; FAVARO, L. C. L.; BOMFETI, C. A.; MESQUITA, S. F. P.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Cultural characterization and conidial dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 383-388, 2003a.

SOUZA-PACCOLA, E. A.; FAVARO, L. C. L.; CASELA, C. R.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Genetic recombination in *Colletotrichum sublineolum*. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 329-334, 2003b.

SUTTON, B. C. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata*.

Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 1980. 696p.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. (Ed.).

Colletotrichum: biology, pathology and control. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

THAKUR, R. P.; MATHUR, K. Anthracnose. In: Frederiksen, R. A.; Odvody, G. (Eds.)

Compendium of Sorghum Diseases. APS Press. St. Paul. 2000. p.10-12.

THOMAS, M. D.; SISSOKO, I.; SACKO, M. Development of leaf anthracnose and its effect on yield and grain weight of sorghum in West Africa. ***Plant Disease***, v. 79, p. 151-153, 1995.

VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Genetic and morphological comparisons of

Glomerella (Colletotrichum) isolates from maize and from sorghum. ***Experimental Mycology***, v. 16, p. 219-229, 1992.

VAN DER BRUGGEN, P.; MARAITE, H. Histopathology of cassava anthracnose disease

caused by *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Manihotis*. ***Parasitica***, v. 43, p. 3-21, 1987.

VAN DER BRUGGEN, P.; GREGOIRE, D.; MARAITE, H. Temperature-induced alterations in the expression of susceptibility of cassava to *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *manihotis*. **Journal of Phytopathology**, v. 130, p. 46-58, 1990.

WAQUIL, J. M. Programa nacional de pesquisa de sorgo. **Relatório Técnico Anual do Centro Nacional de Pesquisa de Milho e Sorgo** 1988-1991, v. 5, p. 18-19, 1992.

WARREN, H. L. Leaf anthracnose. In: Frederiksen, R.A. (Ed.). **Compendium of Sorghum Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1986. p.10-11.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M. A cytological study of compatible and incompatible interactions between *Sorghum bicolor* and *Colletotrichum sublineolum*. **New Phytologist**, v. 134, p. 25-34, 1996.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O'CONNELL, R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v. 91, p. 149-158, 2001.

WILSON, G. W. The identity of anthracnose on grasses in the United States. **Phytopathology**, v. 4, p. 112-116, 1914.

YANG, Z.; PANACCIONE, D. G.; HANAU, R. M. Gene expresión associated with light-induced conidiation in *Colletotrichum graminicola*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 165-167, 1991.

3. ASPECTOS BIOLÓGICOS, ULTRA-ESTRUTURAIS E PATOGÊNICOS DO CONÍDIO OVAL DE *Colletotrichum sublineolum*

3. 1. RESUMO

Neste estudo foi investigado o comportamento de conídios ovais de *Colletotrichum sublineolum* sobre três diferentes materiais artificiais; as características ultra-estruturais entre conídios falcados e ovais e foram analisados qualitativamente a capacidade de infecção destes dois tipos de conídios sobre folhas de sorgo. No processo de adesão e germinação sobre lamínulas revestidas com albumina, membrana de diálise e lâminas recobertas com poliestireno, conídios ovais foram capazes de germinar sobre estes materiais, indicando que, a exemplo dos conídios falcados, também possuem mecanismos de adesão. Os resultados demonstram a capacidade infectiva e patogênica dos conídios ovais sobre plantas de sorgo, sugerindo que estes poderiam representar uma fonte adicional de inóculo e atuar como um agente responsável não só pelo aumento da variabilidade na espécie como também contribuir para com as quebras de resistência na cultura.

Palavras – chave: dimorfismo conidial, microscopia eletrônica de transmissão, patogenicidade

**BIOLOGICAL, ULTRASTRUCTURAL AND PATHOGENIC ASPECTS OF THE OVAL
CONIDIUM of *Colletotrichum sublineolum***

3. 2. ABSTRACT

In this study we investigated the behavior of oval conidia of *Colletotrichum sublineolum* on three different artificial materials; the ultrastructural characteristics between falcate and oval conidia and we analyzed qualitatively the infection capacity of these two types of conidia on sorghum leaves. In the adhesion and germination process on cover slips coated with albumin, dialysis membrane and microscope slides covered with polystyrene, oval conidia were capable of germinating on these materials, indicating that, like falcate conidia, they too possess adhesion mechanisms. The results demonstrate the infective and pathogenic capacity of oval conidia on sorghum plants, suggesting that these could represent an additional source of inoculum and act as a responsible agent not only for the increase in variability in the species but also contributing to overcome resistance in this culture.

Key words: conidial dimorphism, transmission electron microscopy, pathogenicity.

3. 3. INTRODUÇÃO

Antracnose, causada pelo patógeno *Colletotrichum sublineolum*, é uma das mais importantes doenças da cultura do sorgo, estando presente em todas as áreas de plantio de sorgo no Brasil (Casela e Ferreira, 1996). A estratégia mais eficiente para o controle desta doença é a utilização de cultivares resistente. O uso da resistência genética é, entretanto, dificultada pela ocorrência de alta variabilidade na população do patógeno, o que leva a freqüentes quebras de resistência dos cultivares (Casela *et al.*, 1998).

O modo de infecção primária do fungo *C. sublineolum* ocorre por meio dos conídios falcados, produzidos terminalmente em conidióforos nos acérvulos (Warren, 1986). Além dos conídios falcados, Souza-Paccola *et al.* (2003) descreveram a formação de um segundo tipo de conídio, os conídios ovais. Este conídio apresenta forma ovalada, de tamanho menor que o falcado. Panaccione *et al.* (1989) estudando isolados de *Colletotrichum graminicola* em milho observaram que os conídios ovais apresentavam ontogenia distinta dos falcados. Souza-Paccola *et al.* (2003) através da caracterização cultural descreveram conídios ovais como uma alternativa para testes de patogenicidade e estudos genéticos, especialmente para isolados que esporulam pouco em meio de cultura sólido.

São escassas as informações sobre a biologia e patogenicidade destes conídios, de forma que o presente estudo tem como objetivo (i) investigar a germinação de conídios ovais de *C. sublineolum* sobre diferentes materiais artificiais. (ii) observar diferenças celulares e no processo de infecção entre conídios falcados e ovais através da microscopia eletrônica de transmissão e (iii) verificar por meio de análises qualitativas a capacidade de infecção de conídios ovais em comparação com conídios falcados.

3. 4. MATERIAL E MÉTODOS

3. 4. 1. Isolados de *C. sublineolum*, Meios de Cultivo e Esporulação

Colletotrichum sublineolum Henn., Kabát & Bubák, isolados BR 23.02, BR 84.02, BR 85.02, BR 201.01 e BR 204.01, foram cedidos pela EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, Brasil. Para obtenção de conídios falcados, os isolados foram cultivados em meio farinha de aveia-ágar, sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) a uma temperatura de $22 \pm 3^\circ \text{C}$, durante 7 a 10 dias.

Para a produção de conídio oval, seguiu-se a metodologia descrita por Souza-Paccola *et al.* (2003), onde três discos de ágar de 10 mm de diâmetro contendo micélio de *C. sublineolum*, foram usados para inocular 50 mL de meio caldo batata dextrose. A cultura foi mantida sob agitação (60 rpm) por quatro dias a $22 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$). O micélio foi filtrado em gaze e conídios ovais foram recuperados por centrifugação a 6000 g por 5 minutos. O pellet foi ressuspendido em 2 mL de solução de Tween 80 0,01% em água.

3. 4. 2. Caracterização da Condição Nuclear e Monitoramento do Processo de Germinação de Conídios Ovais por Meio da Microscopia de Luz

Para esta etapa foram empregadas três técnicas: uma utilizando lamínulas recobertas com uma fina camada de albumina 50%, o que possibilitou caracterizar os conídios ovais quanto à condição nuclear; a outra técnica empregando cultivo sobre membrana de diálise,

que permitiu o monitoramento da germinação destes conídios e a formação dos apressórios; e uma terceira técnica, utilizando lâminas recobertas com uma camada de poliestireno, onde foi monitorado o processo de germinação de conídios ovais comparado com o de conídio falcado.

3. 4. 2. 1. Observação de conídios sobre lâminulas recobertas com uma fina camada de albumina

Sobre lamínulas contendo uma fina camada de albumina 50%, foi depositada 40 μL de uma suspensão contendo 10^5 conídios ovais mL^{-1} em Tween 80 0,01% em água. Após secagem ao ar, o material foi fixado durante 30 minutos em fixador Carnoy e passado em álcool 95% (5 min) e álcool 70% (30 min). O material foi lavado três vezes em água destilada e hidrolisado em HCl 1N a 60°C durante 10 min. A seguir novamente lavado três vezes em água destilada e 1 vez em tampão fosfato 0,02M, pH 6,9 e então corado com solução Giemsa seguindo a metodologia descrita por Tanaka *et al.* (1979).

3. 4. 2. 2. Germinação de conídios sobre membranas de diálise

Para observação do processo de formação de tubos germinativos e apressórios, conídios ovais foram inoculados sobre membranas de diálise em meio ágar farinha de aveia. O material foi incubado à 25°C sob luz fluorescente contínua ($50\ \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) e as membranas foram removidas em períodos pré-determinados (4, 8, 12, 24h), fixadas em fixador Carnoy e coradas com solução Giemsa usando metodologia descrita por Tanaka *et al.* (1979).

3. 4. 2. 3. Germinação de conídios sobre lâminas recobertas com camada de poliestireno

Alíquotas de 40 μL de uma suspensão de conídios falcados (10^5 mL^{-1}) e de uma suspensão de conídios ovais (10^5 mL^{-1}) dos isolados BR 23.02, BR 84.02, BR 85.02, BR 201.01 e BR 204.01 foram misturadas separadamente em 40 μL de caldo batata dextrose. As suspensões foram colocadas sobre lâminas de microscopia revestidas por uma camada delgada de poliestireno (Mercure *et al.*, 1994). As lâminas recobertas por poliestireno foram obtidas pela imersão destas em uma solução contendo o polímero (uma placa de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro) dissolvido em 50 mL de acetato de amila. Após inoculação as lâminas foram incubadas em câmara úmida sob luz constante a 25° C, sendo a porcentagem de conídios germinados e não germinados determinada nos tempos de 4; 6; 8, 10; 12, 16 horas após inoculação, utilizando lactofenol azul de algodão a fim de paralisar a germinação.

Foram feitas duas repetições para cada tratamento e selecionado ao acaso três campos de cada lâmina para estimar a porcentagem de germinação.

A imagem do processo de germinação foi capturada e posteriormente foram realizadas as medidas necessárias através do sistema digitalizador MOTIC Images 200 - versão 1.2. profissional. Foram medidos 50 conídios para cada tempo.

3. 4. 3. Análises em Microscopia Eletrônica de Transmissão

Cultura líquida contendo conídios ovais foi centrifugada nos tempos 0 e 4h de incubação em tubos eppendorf. O sobrenadante foi descartado e então adicionado ágar-água (10 %). O bloco de ágar contendo a massa de conídios foi retirado do eppendorf e seccionado em segmentos menores. Posteriormente iniciou-se o processo de fixação conforme descrito abaixo.

Amostras de 1 cm de tecido foliar infectado com conídios ovais do cultivar de sorgo BR009, com 3 semanas de desenvolvimento foram pulverizadas com uma suspensão contendo 10^6 conídios ovais mL^{-1} e incubadas em câmara úmida à 25°C . Após 36h da inoculação as amostras foram submetidas ao processo de fixação.

Os blocos de ágar contendo a massa de conídios e os segmentos foliares inoculados com os conídios ovais, foram fixados em glutaraldeído (2,5% vol/vol), formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2, CaCl_2 0,01M. por um período de 24 horas, incluindo 5 min de infiltração a vácuo, lavagem em tampão cacodilato 0,1M (3X 10min), e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 por 1 hora. Após lavagens sucessivas em água destilada (3X 10 min), as amostras foram deixadas em acetato de uranila 0,5% por 12h e desidratadas em uma série gradual de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) durante 10 min para o tecido foliar e 20 min para os blocos de ágar.

A seguir o material foi submetido a uma mistura de resina Spurr acetona 100% (1:1) durante 5h, transferidas para resina Spurr pura por 12 h. Foram acondicionados em forma de silicone contendo resina pura e polimerizados em estufa a 70°C durante 48 h. Os locais de infecção e o aglomerado de conídios nos estádios de desenvolvimento foram identificados pela microscopia de luz. Secções ultrafinas foram coletadas em telinhas de cobre cobertas com formvar e contrastadas com solução aquosa de acetato de uranila e citrato de chumbo. Os espécimes foram examinados em microscópio MET ZEISS EM900.

3. 4. 4. Análise Qualitativa da Capacidade de Infecção de Conídios Falcado e Oval

O trabalho foi conduzido no Laboratório de Fitopatologia e Casa de Vegetação da EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG-Brasil, tendo sido testados conídios ovais e

falcados de dois isolados monospóricos de *C. sublineolum* (BR 204.01 e BR 85.02) em cinco cultivares de sorgo utilizado como diferenciadores (BR005, BR008, BR009, CMSXS210 e SC283), cedidos pela EMBRAPA Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG. As plantas foram desenvolvidas em vasos de cerâmica medindo 23 cm de diâmetro e 30 cm de altura, tendo sido semeadas, em cada vaso, dez sementes de uma mesma cultivar desbastando-se para 4 plantas/vaso antes da inoculação.

Os isolados fúngicos foram cultivados em meio aveia ágar durante sete dias à temperatura de $22^{\circ} \pm 3^{\circ}$ C. A produção de conídio falcado foi induzida pelo método mecânico de raspagem do micélio com auxílio de uma lâmina de metal e as culturas assim injuriadas foram incubadas a $23 \pm 2^{\circ}$ C sob luz branca fluorescente ($50\text{rE}/\text{m}^2/\text{sec}$).

Para a obtenção de conídios ovais inoculou-se 1,5 litros de meio Caldo Batata com sessenta discos miceliais de 1 cm de diâmetro, obtidos a partir de culturas em meio aveia ágar de sete dias de idade. As culturas foram mantidas em condições estáticas durante quatro dias sob luz branca à 25° C. Posteriormente, o micélio foi filtrado em gaze esterilizada e o filtrado contendo os conídios ovais foi centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Ao pellet foi adicionado 10 mL de água destilada, sendo a suspensão ajustada para a concentração de 10^6 conídios ovais mL^{-1} .

Para obtenção de conídios falcados, adicionou-se 10 mL de água destilada em cada placa contendo cultura dos isolados fúngicos em desenvolvimento, sendo em seguida feita uma raspagem superficial com alça de drigalski para liberação dos conídios. A suspensão de conídios falcados assim obtida foi passada através de uma peneira de 42 mesh, sendo em seguida ajustada para a concentração final de 10^6 conídios falcados mL^{-1} .

As inoculações foram feitas aos 25 dias após o plantio, pulverizando-se as folhas com uma suspensão de conídios até o ponto de escorrimento com um pulverizador manual

Uni-spray Mod. 2000 na dose de aproximadamente 20 mL/vaso. Imediatamente inoculadas, as plantas foram acondicionadas em câmara úmida durante 24 horas sendo em seguida transferidas para mesas em casa de vegetação, onde permaneceram até a época da avaliação. As avaliações foram realizadas no 10º dia após a inoculação, utilizando-se o índice de notas apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Registro de um esquema visual para avaliar o desenvolvimento dos sintomas da antracnose em plantas de sorgo inoculadas artificialmente com conídios de *C. sublineolum* (Ferreira e Casela, 1986)

Notas	Sintomas
1	Ausência de sintomas
2	Presença de pequeno número de lesões alongadas sem esporulação ou de reação de hipersensibilidade (infecção leve)
3	Presença de lesões alongadas sem esporulação ou de reação de hipersensibilidade com até 20% da área foliar afetada. Infecção leve a moderada
4	Infecção severa. Grande número de lesões esporulantes e com alguma coalescência . De 21 a 40% da área foliar afetada
5	Infecção muito severa, com lesões abundantes e coalescidas. Mais de 40% da área foliar afetada. Esporulação abundante.

As notas 1, 2 e 3 foram consideradas como indicativas de reação de resistência e as notas 4 e 5, como indicativas de suscetibilidade.

O diâmetro das lesões foliares foi estimado no décimo dia após a inoculação.

As folhas foram retiradas e as lesões medidas com régua. Foram medidas 50 lesões para cada tratamento.

3. 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. 5. 1. Caracterização da Condição Nuclear e Análise do Processo de Germinação de Conídios Ovais e Conídios Falcados por Meio da Microscopia de Luz

Foi comparado o processo de adesão e germinação dos conídios de *C. sublineolum* em três superfícies artificiais, lamínulas revestidas com albumina, membrana de diálise e lâminas recobertas com poliestireno. Conídios ovais foram capazes de germinar sobre estes materiais, indicando que, a exemplo do que ocorre com os conídios falcados, eles também possuem mecanismos de adesão. Segundo Leite *et al.* (2001), os mecanismos de adesão de fitopatógenos aos hospedeiros representam a primeira etapa de conexão física entre o parasita e o parasitado. O sucesso da adesão traz em si um conjunto de fatores evolutivos que determina a atração entre as superfícies envolvidas. O entendimento de como a adesão se processa pode abrir as portas para o controle de algumas doenças de vegetais de importância econômica.

A germinação do conídio é um evento crítico no ciclo de vida da maioria dos fungos, e é um importante fator para o controle da doença, muito embora vários fatores ambientais e fisiológicos possam afetar a germinação em várias espécies (d'Enfert, 1997).

Em *Colletotrichum graminicola*, conídios falcados fixam-se eficientemente na maioria das superfícies artificiais (Mercure *et al.*, 1994 b), permitindo investigações do processo de fixação conidial, germinação e formação do apressório *in vitro*. Mercure *et al.* (1995) visualizaram materiais adesivos produzidos por conídios falcados nesta espécie e Sugui *et al.* (1998) utilizando lâminas recobertas com poliestireno, caracterizaram uma matriz extracelular liberada por estes conídios falcados descrevendo a natureza glicoproteica da mesma. Chaky *et al.*

(2001) investigaram a relação entre características de superfícies artificiais, fixação e germinação de conídios em *C. graminicola*, concluindo que superfícies hidrofóbicas e rígidas foram ambas sinalizadoras na quebra da dormência e do início da germinação do conídio. Apoga *et al.* (2004), também utilizando superfícies artificiais observaram que tubos germinativos de *C. graminicola* requerem mais do que 4 μm de contato contínuo com um substrato hidrofóbico para induzir a formação do apressório.

Os resultados demonstraram a eficiência das três superfícies artificiais aqui empregadas para a condução de estudos referentes à biologia dos conídios ovais e monitoramento dos eventos que ocorrem durante a pré e pós-germinação destes conídios em *C. sublineolum*.

A coloração com HCl - Giemsa confirmou a condição multinucleada dos conídios ovais *C. sublineolum*, que variou de um a quatro núcleos por célula (Figs. 1A e 1B). Estes núcleos apresentaram forma elíptica em todos os isolados avaliados, com diâmetro médio que variou entre 25,35 x 5,83 a 18,54 x 4,76 μm . O isolado BR 84.02 apresentou conídios ovais significativamente maiores, enquanto que o isolado BR 85.02 o menor diâmetro (Tabela 2).

Em trabalhos anteriores já havíamos relatado a ocorrência de conídios ovais uni, bi e trinucleados em *C. sublineolum*, sendo que a frequência de conídios uninucleados foi significativamente maior (Souza-Paccola *et al.*, 2003). Panaccione *et al.* (1989) observaram esta mesma condição em conídios ovais de *C. graminicola* isolados de milho, em uma frequência de 60% uninucleados, 30% binucleados e 10% tri e tetranucleados. O diâmetro destes conídios ovais variou de 6 – 21 x 3 – 6 μm .

Os resultados mostram que a primeira divisão nuclear nos conídios ovais em *C. sublineolum* ocorreu 4 h após a inoculação, no final da germinação, onde um septo central é produzido na porção basal tubo germinativo. Após migração de um dos núcleos para extremidade distal da hifa em crescimento (Fig. 1C) e sucessivas divisões mitóticas vão ocorrendo (Fig. 1D e

1E) determinando a condição multinucleada dos segmentos hifais deste fungo. A formação de apressórios melanizados pôde ser evidenciada 24 h após a inoculação (Fig. 1F).

Tebeest *et al.* (1989), verificaram o número de núcleos em esporos de três espécies de *Colletotrichum* enfatizando a importância de se verificar a condição nuclear da espécie para estudos de natureza genética, como a fusão de protoplastos e a recombinação mediada por plasmídios. Comparando a taxa de germinação entre conídios ovais e falcados (Tabela 3) observa-se que estes não diferiram entre si nas primeiras horas de incubação. A partir de 6 horas, pequenas diferenças na taxa de germinação entre conídios falcados e ovais foram observadas entre os isolados, mas de forma geral ambos os tipos de conídios apresentam taxa de germinação semelhante em praticamente todos os isolados avaliados. Com 16h após a inoculação, todos os isolados apresentam uma frequência de germinação acima de 50%.

Diferenças na germinação foram observadas entre os isolados. Na fase inicial da germinação, 4h e 6 h, os isolados BR 204.01 e o BR 84.02 apresentaram uma taxa de germinação maior, tanto para conídios falcados como para conídios ovais com relação aos outros isolados. A partir de 8h após a inoculação a frequência de germinação foi variável entre os isolados e dependentes do tempo e do tipo de conídio. De forma geral o isolado BR 204.01 mostrou em todos os tempos alta frequência na germinação tanto de conídios falcados como em conídios ovais.

3. 5. 2. Análises Ultra-Estruturais dos Conídios Ovais e Falcados de *C. sublineolum* Através da Microscopia Eletrônica de Transmissão

Características celulares de conídios ovais foram observadas em relação a conídios falcados através da microscopia eletrônica de transmissão. Conídios falcados (Fig. 2A) e

conídios ovais (Fig. 3A, 4C e 4D) apresentam citoplasma com grande quantidade de corpos lipídicos. Conídios falcados de *C. sublineolum* são uninucleados (Fig. 2B – 2C) apresentando parede celular mais delgada comparada com a parede celular de conídios ovais (Fig. 3A – 3C). A presença de corpos lipídicos semelhantes aos aqui observados, também foram descritos em conídios falcados não germinados de *C. graminicola* (Mims *et al.*, 1995).

No início da emissão dos tubos germinativos, aproximadamente 4 horas após a inoculação, um acúmulo de corpos lipídicos pode ser visto na base do tubo germinativo em desenvolvimento (Fig. 5A), demonstrando a mobilização de lipídios, necessária para o processo de germinação (Schadeck *et al.*, 1998). Uma diferenciação das camadas da parede celular promove a formação do septo (Fig. 5B).

Após a emissão do tubo germinativo do conídio oval forma-se um apressório (Fig. 5C e 5D) altamente vacuolado com presença abundante de corpos lipídicos e formação de material adesivo ao seu redor, o que caracteriza o início do processo de penetração sobre a folha de sorgo.

3. 5. 3. Análise Qualitativa da Capacidade de Infecção de Conídios Falcados e Oval

Uma vez constatado um comportamento semelhante do conídio oval com o conídio falcado nos processos de adesão, germinação e formação de apressório, objetivou-se avaliar a virulência destes comparada ao do conídio falcado. No décimo dia após a inoculação, as plantas de sorgo inoculadas com conídios ovais e com conídios falcados reproduziram sintomas de antracnose caracterizados pela produção de lesões elípticas à circulares o que comprova a patogenicidade dos conídios ovais.

Nas Tabelas 4 e 5 são mostradas as reações das cultivares de sorgo aos conídios ovais e falcados de três isolados de *C. sublineolum*. A cultivar BR009, descrita como suscetível pelo programa de melhoramento da Embrapa Milho e Sorgo quando inoculada com conídios falcados também, demonstrou ser suscetível aos conídios ovais (Tabela 4 e 5).

Conídios ovais do isolado BR 85.02 quebraram a resistência da cultivar BR005 considerada resistente e da cultivar CMSXS210 considerada intermediária (Tabela 4).

A Tabela 6 mostra que, com exceção do isolado BR 204.01, conídios ovais formaram lesões sobre folhas de sorgo que não diferiram em tamanho daquelas produzidas pelos conídios falcados. Tanto conídios ovais como falcados produzidos pelo isolado BR 204.01 também quebraram a resistência da cultivar BR005.

Os resultados aqui apresentados demonstram a capacidade infectiva e a patogenicidade dos conídios ovais sobre plantas de sorgo, sugerindo que estes poderiam representar uma fonte adicional de inóculo e atuar como um agente responsável não só pelo aumento da variabilidade na espécie como também contribuir para com a quebra de resistência na cultura.

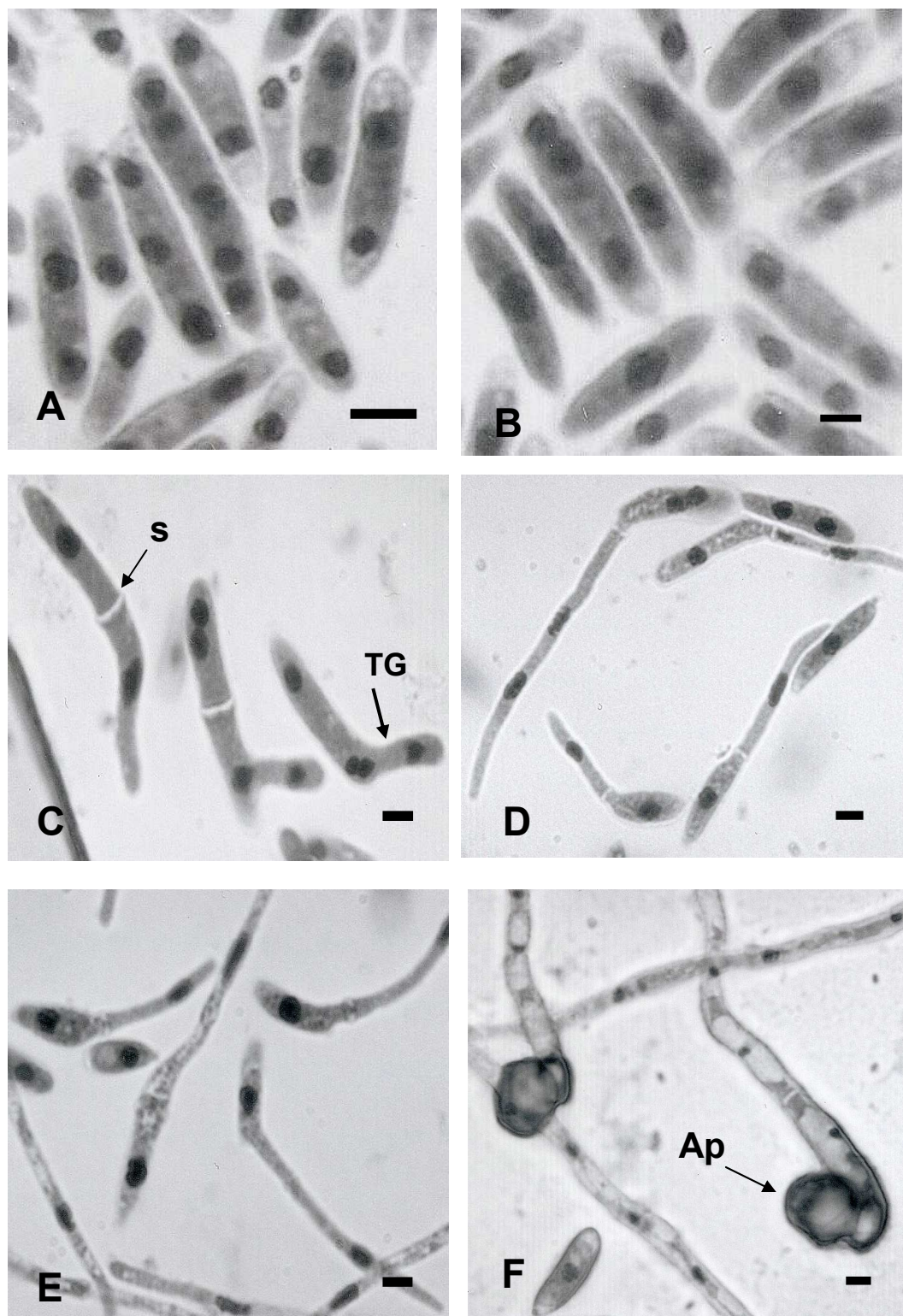


Figura 1. Microscopia de luz de conídios ovais de *Colletotrichum sublineolum* pela técnica de HCl-Giemsa de coloração de núcleo. (A e B) conídios ovais com 1, 2 e 3 núcleos (Barra A: 9 μ m; B: 6 μ m); (C) germinação de conídios ovais após 4 horas de inoculação, presença de tubo germinativo (TG), septo (s) (Barra 4,5 μ m); (D) conídios com 8 horas de inoculação (Barra 4 μ m); (E) conídios com 12 horas de inoculação (Barra 4 μ m); (F) após 24 horas de inoculação presença de apressório (Ap) nas extremidades das hifas (Barra 4,5 μ m).

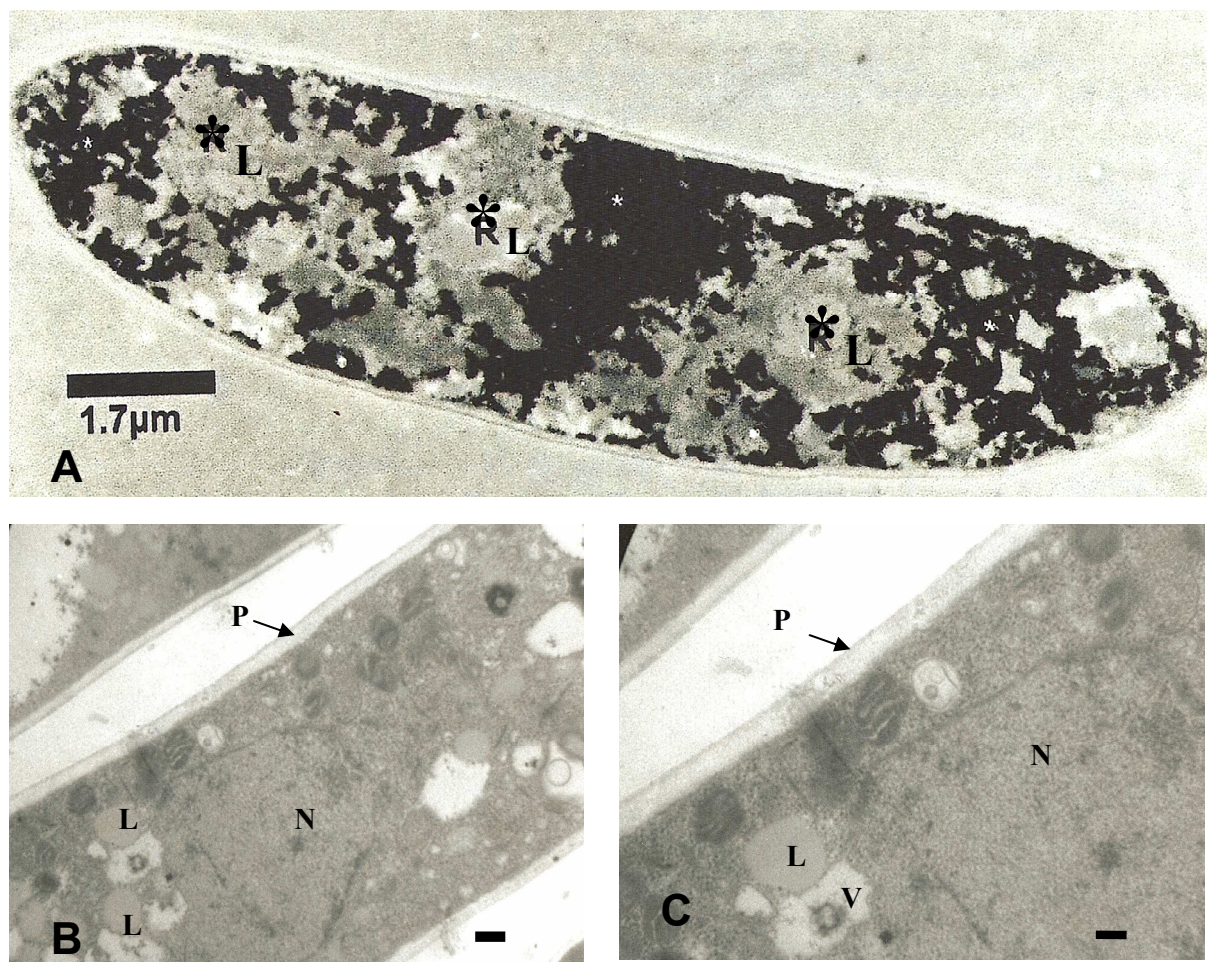


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão de conídios falcados de *C. sublineolum* (corte longitudinal). (A) Conídio falcado com citoplasma eletrodense com abundante presença de corpos lipídicos (*L) e parede celular pouco espessa (Barra 1,7 μm). (B – C) Visualização de conídios falcados uninucleados (N) com corpos lipídicos (L) e vacúolos (V). (Barra B - 0,9 μm; C - 0,6 μm).

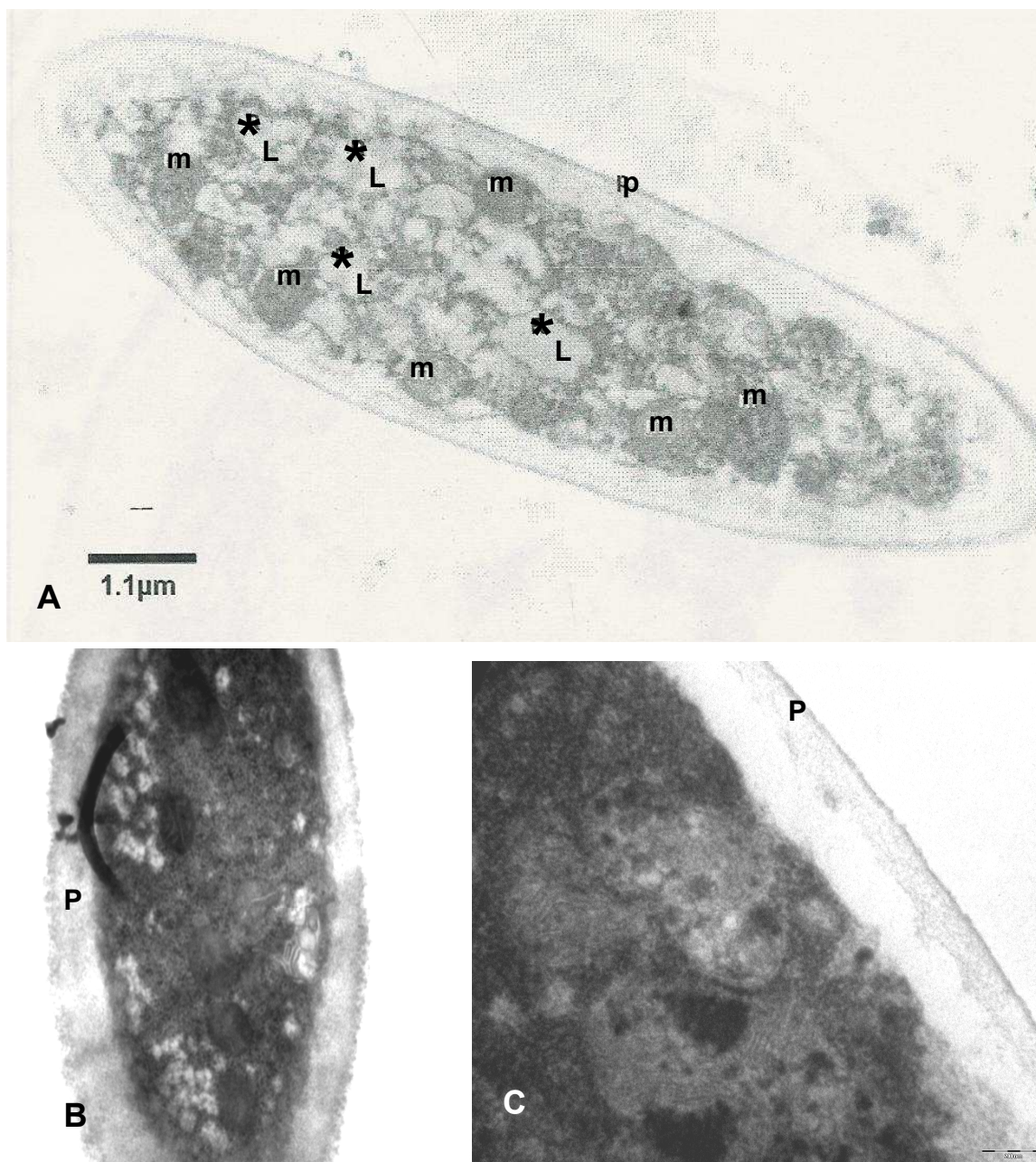


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão de conídios ovais de *C. sublineolum* (corte longitudinal) (A – C) Conídio oval mostrando corpos lipídicos (*L), mitocôndrias (m) e parede celular (P) (Barra: A - 1,1 μm; B - 1 μm; C - 200 nm).

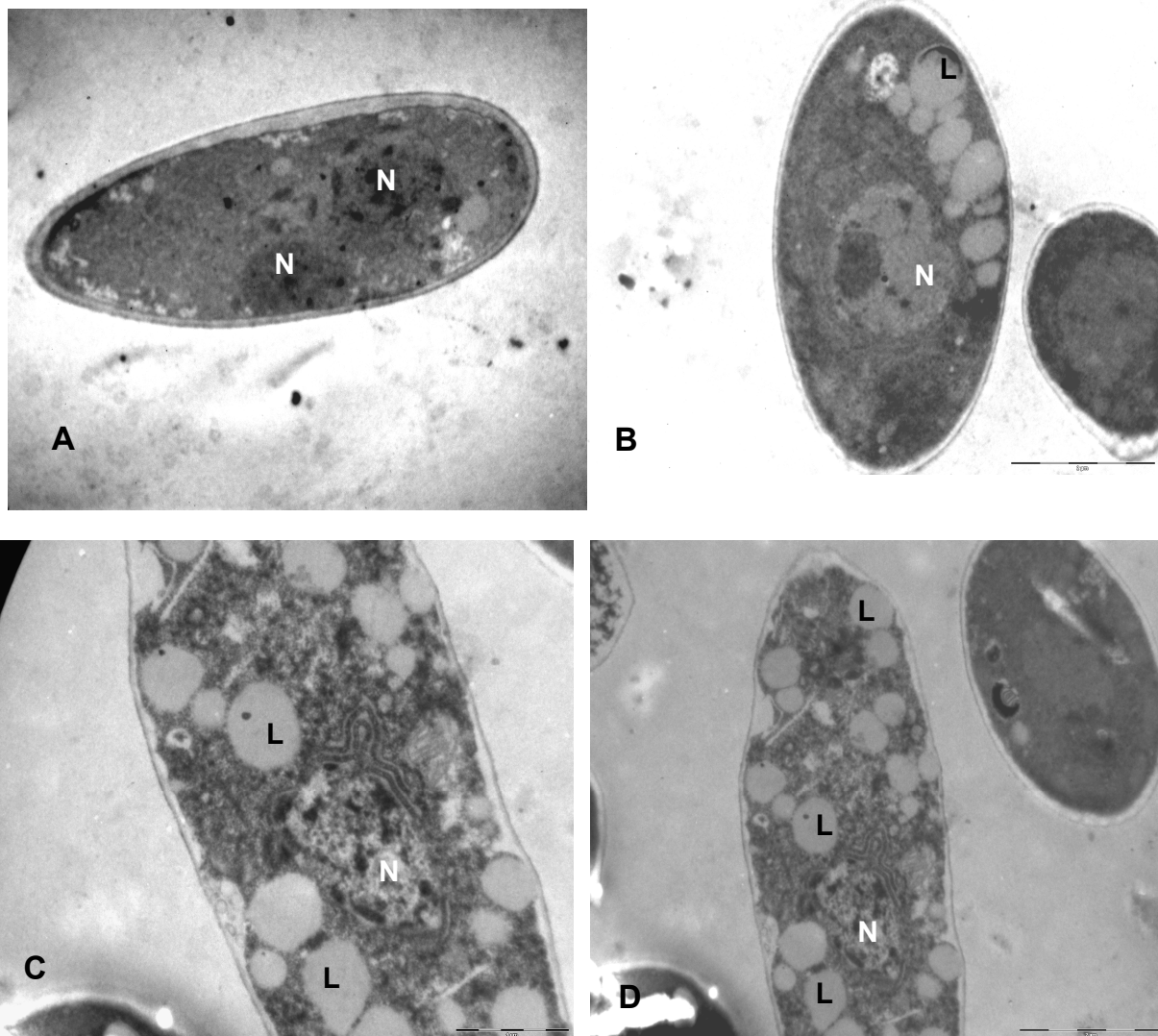


Figura 4. Microscopia eletrônica de transmissão de conídios ovais (corte longitudinal). (A) conídio oval binucleado (N) (Barra 2 μm); (B-D) conídio oval uninucleado (N) com corpos lipídicos (L) (Barra: B - 2 μm ; C - 1 μm ; D - 2 μm).

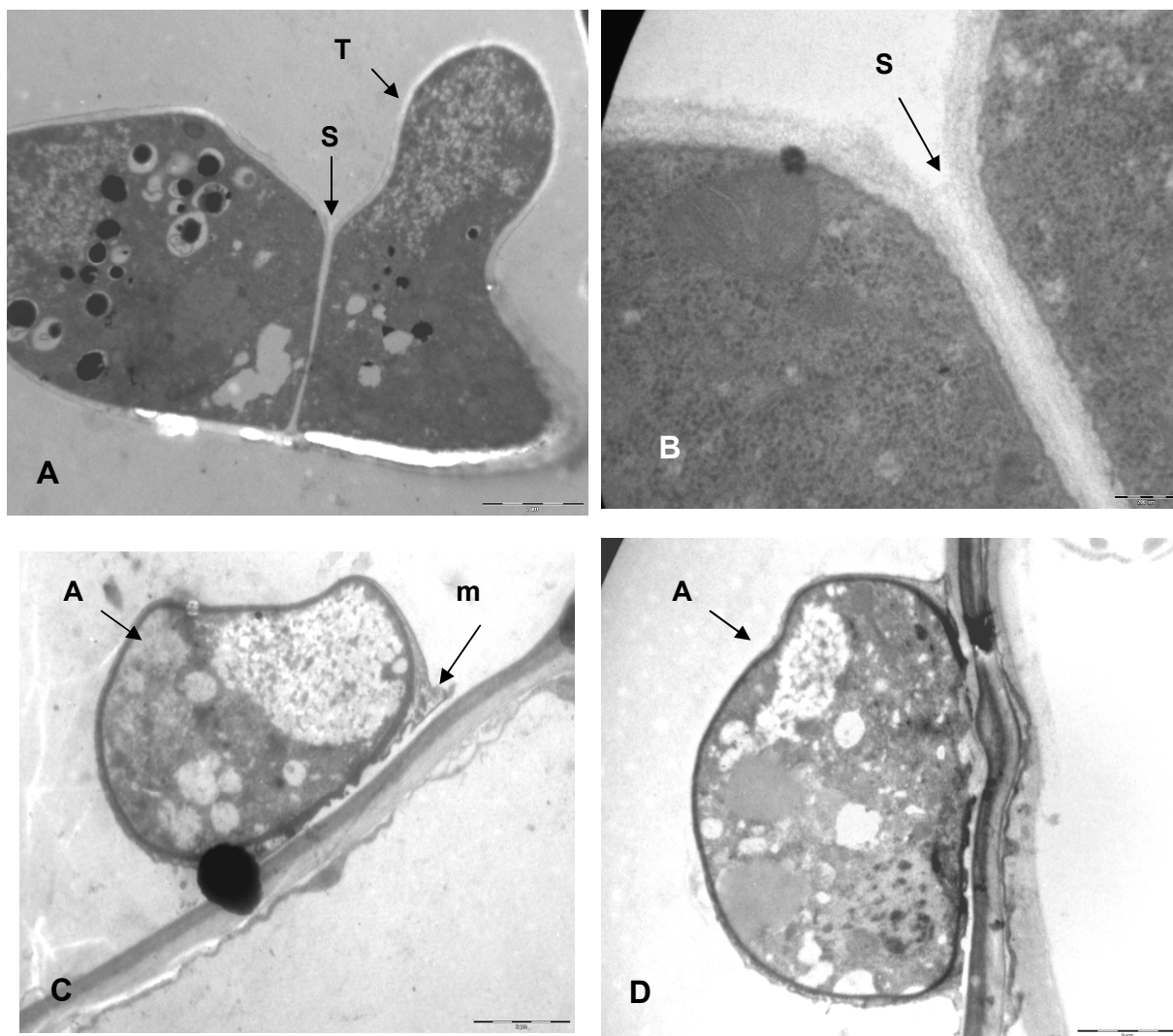


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão de conídios ovais germinando (corte longitudinal). (A – B) Conídio oval com 4 h após a inoculação, com formação do septo (S) e tubo germinativo com grande quantidade de corpos lipídicos (Barra: A - 2 μ m; B - 200 nm). (C – D) Após 36 h de inoculação sobre folhas de sorgo. (C) Formação do apressório com a visualização de material adesivo (ma) em contato com a superfície foliar e (D) apressório iniciando o processo de penetração sobre a superfície da célula vegetal (Barra 2 μ m).

Tabela 2. Diâmetro médio (μm) de conídios ovais de cinco isolados de *Colletotrichum. sublineolum* sobre lâminas de poliestireno, em intervalos de tempo após a inoculação. (Média do diâmetro de 50 conídios para cada tempo).

Isolados	Diâmetro Médio dos conídios (μm)			
	0 hora	4 horas	8 horas	12 horas
BR 23.01	12,3 c ⁽¹⁾	10,9 b	9,54 c	9,33 c
BR 84.02	15,6 a	14,2 a	14,20 a	14,14 a
BR 85.02	11,6 d	12,0 ab	11,63 b	11,17 b
BR 201.01	14,4 b	13,6 a	11,73 b	11,91 b
BR 204.01	12,2 c	12,5 ab	12,33 ab	11,74 b

cv (%): 11,47

⁽¹⁾ Média dos isolados, para conídio oval no mesmo tempo, seguida de mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

cv (%): coeficiente de variação

Tabela 3. Frequência da germinação de conídios falcados e ovais de cinco isolados de *Colletotrichum sublineolum* sobre lâminas de poliestireno, em intervalos de tempo definidos após a inoculação (Média de seis repetições).

	Frequência de germinação de conídios (%)											
	4h		6h		8h		10h		12h		16h	
	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval
BR 23.02	35 b ⁽¹⁾ A ⁽²⁾	44 b ⁽¹⁾ A ⁽²⁾	53 b B	63 b A	58 b B	89 a A	59 c A	70 b A	83 c A	87 c A	92 b A	93 b A
BR 84.02	78 a A	82 a A	81 a A	72 ab A	89 a A	83 a A	89 b A	91 a A	93 b A	96 b A	96 ab A	98 ab A
BR 85.02	6 c A	4 d A	18 c A	15 d A	25 c A	19 c A	82 b A	64 b B	90 bc A	51 d B	95 ab A	52 c B
BR 201.01	26 b A	21 c A	24 c B	35 c A	55 b A	52 a A	45 c A	42 c A	68 d A	30 e B	60 c A	49 c A
BR 204.01	85 a A	85 a A	81 a A	77 a A	94 a A	89 a A	98 a A	89 a A	100 a A	100 a A	100 a A	100 a A
cv (%)	6,89		4,61		7,86		5,52		3,68		6,68	

⁽¹⁾ Médias seguidas pela mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

⁽²⁾ Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, na linha para o mesmo tempo, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

cv (%): coeficiente de variação

Tabela 4. Reações de cinco cultivares de sorgo a conídios falcados e ovais de dois isolados monospóricos de *Colletotrichum sublineolum* (Época I)

Cultivares	Isolados ¹			
	BR 85.02	BR 85.02	BR 204.01	BR 204.01
	Falcado	Oval	Falcado	Oval
BR005	R	S	R	R
BR008	R	R	R	R
BR009	S	S	S	S
CMSXS210	S	S	R	R
CMSXS169	R	R	S	R

¹ R indica reação de resistência e S indica reação de suscetibilidade.

Tabela 5. Reações de cinco cultivares de sorgo a conídios falcados e ovais de dois isolados monospóricos de *Colletotrichum sublineolum* (Época II)

Cultivares	Isolados ¹			
	BR 85.02	BR 85.02	BR 204.01	BR 204.01
	Falcado	Oval	Falcado	Oval
BR005	S	R	S	S
BR008	R	R	R	R
BR009	S	S	S	S
SC283	R	R	R	R
CMSXS210	R	R	R	R

¹ R indica reação de resistência e S indica reação de suscetibilidade.

Tabela 6. Diâmetro médio (cm) de lesões formadas em folhas de sorgo da cultivar BR009 por conídios falcados e ovais de quatro isolados de *Colletotrichum sublineolum*. (Média de 50 lesões para cada isolado e conídio).

Conídios	Diâmetro das lesões sobre folhas de sorgo (cm)			
	Isolados			
	BR 23.02	BR 84.02	BR 85.02	BR 204.01
Falcado	0,44 a A	0,44 a A	0,39 a A	0,47 a A
Oval	0,40 a A	0,40 a A	0,39 a A	0,31 b B

cv (%): 30,64

⁽¹⁾ Média dos isolados, para conídios falcados e ovais, seguida de mesma letra minúscula, na coluna, não difere entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

⁽²⁾ Média dos conídios falcados e ovais, seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

cv (%): coeficiente de variação

3. 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

APOGA, D.; BARNARD, J.; CRAIGHEAD, H. G.; HOCH, H. C. Quantification of substratum contact required for initiation of *Colletotrichum graminicola* appressoria. **Fungal Genetics and Biology**, v. 41, p. 1-12, 2004.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S. **Antracnose do sorgo** (*Colletotrichum graminicola*). Sete Lagoas: EMBRAPA-CNPMS. Circular técnica, p. 28, 1998.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; BRANCÃO, N. Variabilidade e estrutura de virulência em *Colletotrichum graminicola* em sorgo. **Fitopatologia Brasileira**. v. 21; p. 357-361, 1996.

CHAKY, J.; ANDERSON, K.; MOSS, M.; VAILLANCOURT, L. Surface hydrophobicity and surface rigidity induce spore germination in *Colletotrichum graminicola*. **Phytopathology**, v. 91, 558-564, 2001.

d'ENFERT, C. Fungal spore germination: insights from the molecular genetics of *Aspergillus nidulans* and *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, v. 21, 163-172. 1997.

FERREIRA, A. S.; CASELA, C. R. Raças patogênicas de *Colletotrichum graminicola*, agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor*). **Fitopatologia Brasileira**. 11:83-87. 1986.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 9, p119-157, 2001.

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 45, p. 407-420, 1994a.

MERCURE, E. W.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 45, p. 421-440, 1994b.

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Visualization of materials released from adhered, ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**. v. 46, p. 121-135, 1995.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. **International Journal of Plant Sciences**, v. 156, p. 9-18, 1995.

PANACCIONE, D. G.; VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**. v. 81, p. 875-882, 1989.

SCHADECK, R. J. G.; BUCHI, D. F.; LEITE, B. Ultrastructural aspects of *Colletotrichum graminicola* conidium germination, appressorium formation and penetration on cellophane membranes: focus on lipid reserves. **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v. 30, p. 555-561, 1998.

SOUZA-PACCOLA, E. A.; FAVARO, L. C. L.; BOMFETI, C. A.; MESQUITA, S. F. P.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Cultural characterization and conidial dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*. **Journal Phytopathology**, v. 151, p. 383-388, 2003.

SUGUI, J. A., LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Partial characterization of the extracellular matrix released onto hydrophobic surfaces by conidia and conidial germlings of *Colletotrichum graminicola*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 52, p. 411-425, 1998.

TANAKA, Y; MURATA, N.; KATO, H. Behavior of nuclei and chromosomes during ascus development in the mating between either rice-strain or weeping lovegrass-strain and ragi-strain of *Pyricularia*. **Annual Phytopathology Society Japan**. v. 45, 182-191, 1979.

TeBEEST, D. O.; SHILLING, C. W.; RILEY, L. H.; WEIDEMANN, G. J. The number of nuclei in spores of three species of *Colletotrichum*. **Mycologia**, v. 81, p. 147-149. 1989.

WARREN, H. L. Leaf anthracnose. In: Frederiksen, R.A. (Ed.). **Compendium of Sorghum Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1986. pp.10-11.

4. MORFOGÊNESE E MECANISMO DE PENETRAÇÃO DE CONÍDIOS FALCADOS E OVAIS DE *Colletotrichum sublineolum*

4. 1. RESUMO

A antracnose, causada pelo fungo *Colletotrichum sublineolum* é uma importante doença e afeta economicamente a cultura do sorgo no Brasil. Observações da presença de dimorfismo conídial neste fungo nos levaram a estudar os estádios de desenvolvimento e o mecanismo de penetração de conídios falcados e ovais de *C. sublineolum* através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Conídios falcados quando colocados sobre lâminas de poliestireno, após 16 horas de incubação sob luz constante, germinaram e formaram hifas espessas com grande quantidade de vacúolos, que deram origem a conídios ovais em regiões apicais e laterais das mesmas. Conídios falcados quando inoculados sobre folhas de sorgo, iniciaram o processo de germinação após 4 horas e em 24 h o tubo germinativo sofreu uma complexa diferenciação em sua extremidade livre, formando um apressório globoso dando início ao processo de fixação sobre a epiderme foliar. Com 32 h formou-se um denso micélio e abaixo desse micélio pode se observar conídios ovais em processo de germinação. Conídios ovais quando inoculados sobre folhas de sorgo, iniciaram o processo de germinação com a formação do tubo germinativo também 4 h após a inoculação e, da mesma forma que o conídio falcado, com 24h, formaram apressórios que se aderiram à superfície foliar. Transcorridas 48 h de inoculação, formou-se um emaranhado de hifas e sobre esta superfície originou-se acérvulos com setas contendo conídios falcados envoltos por mucilagem. Nenhuma penetração do tubo germinativo nem do apressório através dos estômatos foi observada. Conídios ovais apresentam semelhanças nos eventos de pré-penetração e penetração com os conídios falcados de *C. sublineolum*.

Palavras-chave: dimorfismo conídial, microscopia eletrônica de varredura, *Colletotrichum sublineolum*

MORPHOGENESIS AND PENETRATION MECHANISMS BY FALCATE AND OVAL CONIDIA OF *Colletotrichum sublineolum*.

4.2. ABSTRACT

Anthracnose, caused by *Colletotrichum sublineolum*, is an important disease and seriously affects sorghum crops in Brazil. Observations for the presence of conidial dimorphism in this fungus led us to study the stages of development and the penetration mechanism of the falcate and oval conidia of *C. sublineolum* through light microscopy and scanning electron microscopy. Falcate conidia, when placed under polystyrene microscope slides, after 16 hours of incubation under constant light, germinated and formed thick hyphae with large quantities of vacuoles, and originated oval conidia in the apical and lateral regions of the hyphae. Falcate conidia, when inoculated in sorghum leaves, initiated the germination process after 4 hours and with 24 hours the germ tube suffered a complex differentiation in its free extremity, forming a globose appressorium, initiating the process of fixation upon the foliar epidermis. With 32 hours, a dense mycelium was formed and under it could be observed oval conidia in the germination process. Oval conidia, when inoculated in sorghum leaves, also initiated the germination process with the formation of the germ tube 4 hours after inoculation and, in the same way as falcate conidia, formed appressoria that adhered to the foliar epidermis with 24 hours. Forty-eight hours after inoculation, tangled hyphae were formed and acervuli with setae containing falcate conidia wrapped in mucilage, appeared on the surface. No penetration of the germ tube or appressorium through stomata was observed. Oval conidia exhibit similarities to falcate conidia of *C. sublineolum* in the pre-penetration and penetration events.

Key words: conidial dimorphism, scanning electron microscopy, *Colletotrichum sublineolum*.

4. 3. INTRODUÇÃO

Colletotrichum sublineolum P. Henn. Kabát & Bubák. (Sutton, 1980; Sherriff *et al.*, 1995), agente causal da antracnose em sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), encontra-se presente em todas as áreas de plantio desta cultura no Brasil (Casela *et al.*, 2001). *Colletotrichum sublineolum* produz frutificações denominadas acérvulos, de coloração escura que podem ser visualizadas no centro das lesões. Os conidióforos são eretos, hialinos e não septados e deles são produzidos terminalmente conídios hialinos, não septados e falciformes (Warren, 1986), denominados de conídios falcados (Sutton, 1980).

O agente causal da antracnose em cereais, incluindo milho e sorgo, foi considerado durante muito tempo, como formas diferentes da mesma espécie, *Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson (Syn. *Colletotrichum sublineolum* P. Henn). No entanto, aspectos da morfologia do apressório (Sutton, 1968), testes de cruzamentos (Vaillancourt e Hanau, 1992) análises de “fingerprints” de DNA e seqüências de DNAr (Sherriff *et al.*, 1995), demonstraram claramente que isolados de milho e sorgo são espécies distintas. Portanto, isolados de milho são agora denominados *C. graminicola*, enquanto que os isolados de sorgo são designados *C. sublineolum*. Muito do que se conhece sobre a biologia do agente da antracnose tem sido estudado em isolados de *C. graminicola* em milho. Nishihara (1975) descreveu um segundo tipo de conídio em *C. graminicola*, além do conídio falcado, o conídio oval. Segundo Panaccione *et al.* (1989), esses dois tipos de conídios são observados tanto em cultura quanto durante o processo de infecção em folhas de milho. O primeiro tipo, o conídio falcado é produzido blasticamente a partir de células conidiógenas morfologicamente distintas. O segundo tipo, produzido blasticamente a partir hifas, tem forma oval a elíptica, de tamanho variado, porém menor que o conídio falcado.

Esse dimorfismo conidial também foi relatado posteriormente em isolados de *C. sublineolum* em sorgo por Souza-Paccola *et al.* (2003). Os autores demonstraram a importância dos conídios ovais como uma ferramenta alternativa para estudos genéticos e em testes de patogenicidade. O processo de infecção de conídios falcados tem sido analisado tanto em *C. graminicola* sobre folhas de milho (Politis, 1976; Politis e Wheeler, 1973; Mims, *et al.*, 1995; Mims e Vaillancourt, 2002) quanto em *C. sublineolum* em sorgo (Wharton e Julian, 1996; Wharton *et al.*, 2001). Entretanto, não há informações disponíveis sobre a formação, germinação e penetração de conídios ovais de *C. sublineolum* na planta de sorgo. Foram estudados os estádios de desenvolvimento e o mecanismo de penetração de conídios falcados e ovais de *C. sublineolum* sobre folhas de sorgo através da microscopia eletrônica de varredura e microscopia de luz.

4. 4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 4. 1. Cultivo e Esporulação do Fungo

Colletotrichum sublineolum isolado BR 204.01, foi cedido pela EMBRAPA Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG Brasil. Conídios falcados, foram produzidos em meio farinha de aveia-ágar, mantendo a cultura sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) a uma temperatura de $22 \pm 3^\circ \text{C}$, durante 7 a 10 dias.

Conídios ovais foram obtidos em cultura líquida, inoculando três discos (10mm de diâmetro) de micélio em 50 mL de caldo batata. A cultura foi mantida sob agitação (60 rpm) por quatro dias a $22 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$), posteriormente filtrada em gase e os conídios ovais recuperados por centrifugação a 6000 g por 5 min. O pellet foi ressuspendido em 2 mL de solução de Tween 80, 0,01% em água.

4. 4. 2. Morfogênese dos Conídios Ovais

Para acompanhamento da formação dos conídios ovais, uma alíquota de 40 μL da suspensão na concentração de 10^6 conídios falcados mL^{-1} foi colocada sobre lâminas de microscopia revestidas por uma camada delgada de poliestireno (Mercure *et al.*, 1994). Este procedimento consistiu em imergir as lâminas em uma solução contendo o polímero (uma placa de Petri de poliestireno com 90 mm de diâmetro) dissolvido em 50 mL de acetato de amila. Após secagem as lâminas foram inoculadas e incubadas em placas de Petri a $22 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz fluorescente constante ($50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) por 2, 4, 8, 10, 12, 16 e 24 horas. Após cada tempo de

incubação, as lâminas foram retiradas das placas de Petri, cobertas com lamínula e observadas em microscópio óptico.

4. 4. 3. Análises em Microscopia Eletrônica de Varredura

4. 4. 3. 1. Fixação com aldeído

Segmentos foliares de 1cm² oriundos da cultivar BR009, com três semanas de desenvolvimento foram retirados das plantas de sorgo e pulverizados com suspensão de conídios ovais e falcados cada uma contendo aproximadamente 10⁶ mL⁻¹ conídios. Os segmentos foliares foram incubados em câmara úmida à 25° C, removidos em intervalos de tempo pré-determinados (0, 4, 8, 12, 24, 32 e 48h) e fixados em 2,5% (v/v) glutaraldeído, 2,5% formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05M (pH 7,2) e CaCl₂ 0,001M por 24h à 4°C.

4. 4. 3. 2. Pós-fixação com tetróxido de ósmio (OsO₄)

As amostras pré-fixadas foram lavadas em aldeído com 3 passagens de cerca de 10 min em tampão cacodilato 0,05M pH 7,2 e fixadas em volume igual de tetróxido de ósmio 2% em tampão cacodilato 0,1M durante 1h. As amostras fixadas em tetróxido de ósmio foram lavadas 3 passagens de 10 min em água destilada, seguido da desidratação em solução em série de concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 3X em 100%) durante 10 min, secas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e observadas em microscópio ZEISS DSM 940A.

4. 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 5. 1. Morfogênese dos Conídios Ovais

Sobre lâminas recobertas com poliestireno, hifas provenientes de conídios falcados, cresceram e se diferenciaram resultando em conídios ovais maduros, que se formaram nas regiões laterais e apicais das mesmas, com 16 horas após exposição na luz (Figs. 1-5). As hifas que deram origem aos conídios ovais mostraram-se mais espessas e altamente vacuoladas.

Panaccione *et al.* (1989) descreveram em isolados de *C. graminicola*, a produção de dois tipos de conídios tanto em meio de cultura como durante o processo de infecção em folhas de milho. O primeiro, o conídio falcado, produzido em acérvulos e o segundo tipo, o conídio oval, de forma oval a elíptica formado a partir de hifas diferenciadas. Segundo Yang *et al.* (1991), na ausência de luz as células conidiogênicas não se diferenciam enquanto que a luz altera a expressão do gene que induz a conidiação em hifas vegetativas.

Souza-Paccola *et al.* (2003) também relataram dimorfismo conidial em isolados de *C. sublineolum*, onde conídios ovais tornaram-se uma alternativa para testes de patogenicidade e estudos genéticos, especialmente para isolados que dificilmente esporularam em meio sólido.

4. 5. 2. Análise do Processo de Germinação e Infecção dos Conídios Ovais e Falcados em Folhas de Sorgo por Meio da Microscopia Eletrônica de Varredura

No presente estudo, através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível relatar pela primeira vez os eventos ocorridos durante o processo de germinação de conídios

ovais de *C. sublineolum* e a pré-penetração dos tubos germinativos oriundos destes. A semelhança do que ocorreu com os conídios falcados, logo após a deposição na superfície foliar quando em contato com um filme de água, os conídios ovais iniciaram o processo de germinação.

Conídios falcados (Fig. 6), depositados sobre a superfície das folhas de sorgo, deram início ao processo de germinação após 4 horas de inoculação com a formação do tubo germinativo seguida de septação (Fig. 7). Com 24 horas o tubo germinativo sofreu uma complexa diferenciação na sua extremidade livre, formando um apressório globoso dando início ao processo de fixação na epiderme da folha (Fig. 8).

A germinação de conídios dentro do gênero *Colletotrichum* é bastante variável, iniciando-se entre 4 a 48 horas (Bailey *et al.*, 1992; Roberts e Snow, 1984) e é dependente de fatores externos tais como temperatura e presença de materiais exógenos (Bailey *et al.*, 1992). Segundo Wharton e Julian (1996), a maioria dos conídios falcados de *C. sublineolum* germinam após 9h de inoculação, e com 18h, quase 100% dos esporos germinados produzem apressórios de coloração marrom escuro.

A adesão do esporo na superfície do hospedeiro é reconhecida, por vários autores, como sendo um evento essencial para o sucesso da infecção (Mendgen e Deising, 1993; Mercure *et al.*, 1994) influenciando inclusive no desenvolvimento da doença, pois a rápida adesão dos conídios aumenta a chance de sucesso no estabelecimento do patógeno na cultura (Mercure *et al.*, 1994).

Transcorridas 32 horas, conídios falcados germinaram e formaram um micélio denso sobre a folha e abaixo do micélio, pôde ser observada a formação de um tipo de conídio ovalado (Fig. 9), semelhante ao conídio oval, os quais germinam e formam o septo (Fig. 10).

Foi possível então caracterizar eventos morfológicos associados ao desenvolvimento de conídios falcados, através da observação de hifas que se desenvolveram

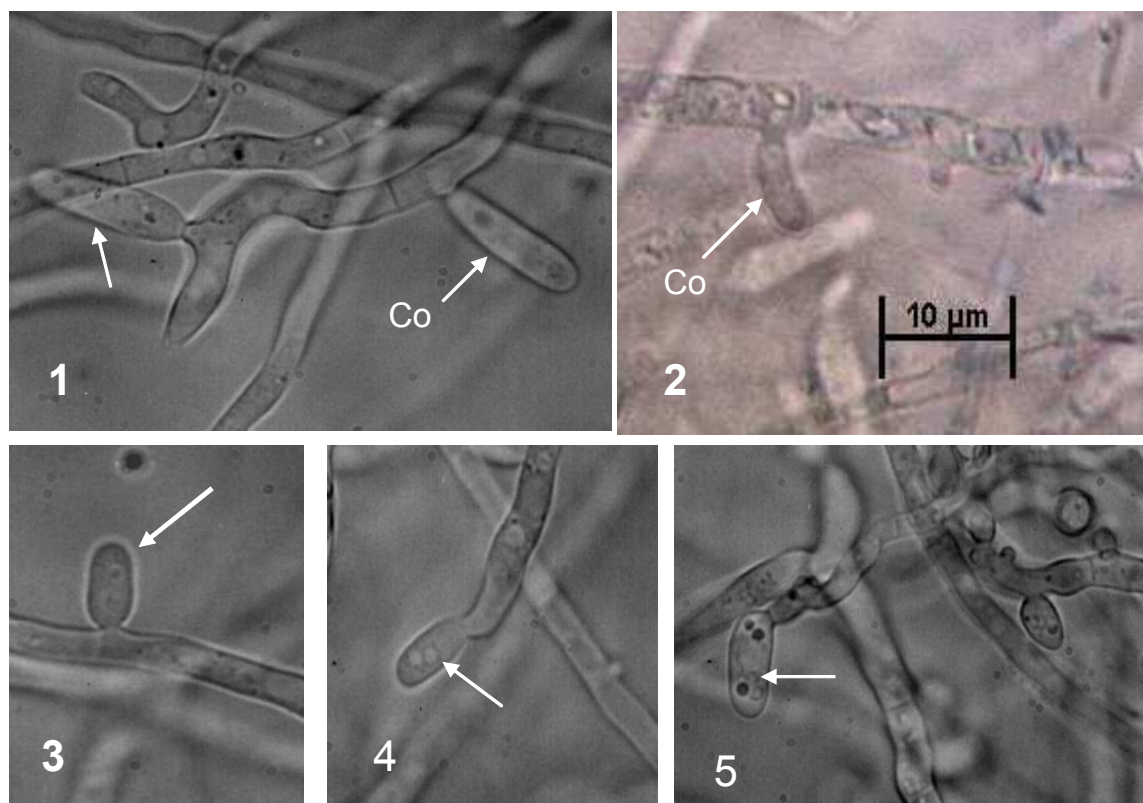
sobre a superfície da folha. Após 24 horas de inoculação (Figs. 11-16), conídios ovais foram produzidos blasticamente em região lateral e apical de hifas conidiogênicas. Uma pequena protuberância no conídio oval mostra onde ocorreu a formação da parede celular na separação do conídio com a hifa (Fig. 16).

Quando conídios ovais foram inoculados sobre folhas de sorgo (Fig. 17), após 4 horas de inoculação (Fig. 18-20), os conídios iniciaram o processo de germinação com a formação do tubo germinativo na extremidade ou nas laterais do conídio. Nas Figs. 18-20, com 4 horas de inoculação, visualiza-se a formação de septo no centro do conídio oval.

Seguida a inoculação, estes conídios ovais germinaram, emitiram um tubo germinativo na superfície da folha e com 24 horas, formou-se a estrutura de infecção, o apressório (Fig. 21). Não foi observada a penetração do tubo germinativo nem do apressório através dos estômatos. As Figs. 22-24, permitem observar a formação de um apressório globoso decorrente do inchaço da hifa que se aderiu à superfície foliar. O poro de penetração pode ser visualizado nos apressórios que se desprenderam da folha (Figs 23 e 24).

Seguidas 48 horas de inoculação dos conídios ovais, um emaranhado de hifas foi formado sobre a superfície foliar o qual continha acérvulos com setas, onde foram produzidos conídios falcados envoltos por mucilagem (Fig. 25-27).

Conídios ovais de *C. sublineolum* apresentaram comportamento semelhante aos conídios falcados durante os processos de pré-penetração e penetração sobre folhas de sorgo. Os conídios ovais, como descrito anteriormente são produzidos em meio de cultura líquido (Souza-Paccola, *et al.*, 2003), mas os resultados aqui apresentados demonstram que os mesmos podem ser formados abaixo de hifas desenvolvidas sobre a superfície foliar de plantas de sorgo.

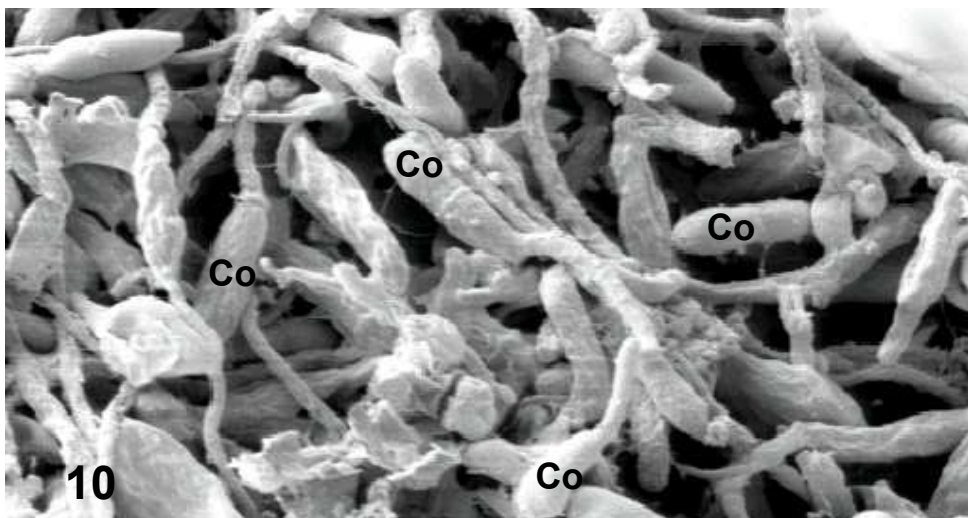
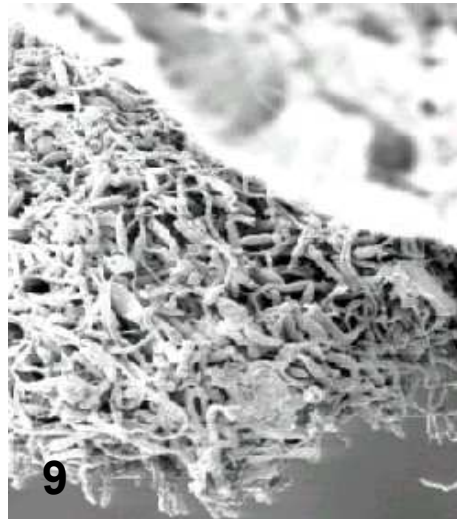
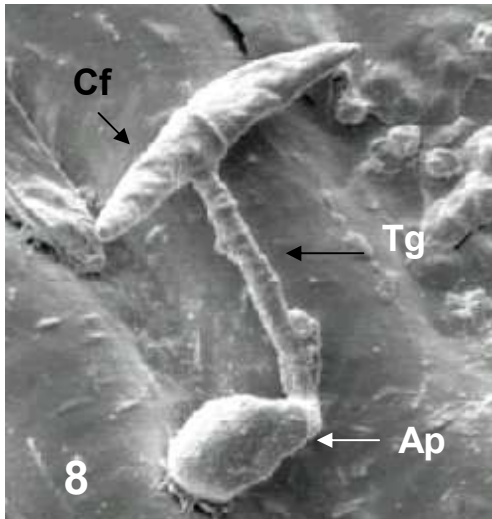
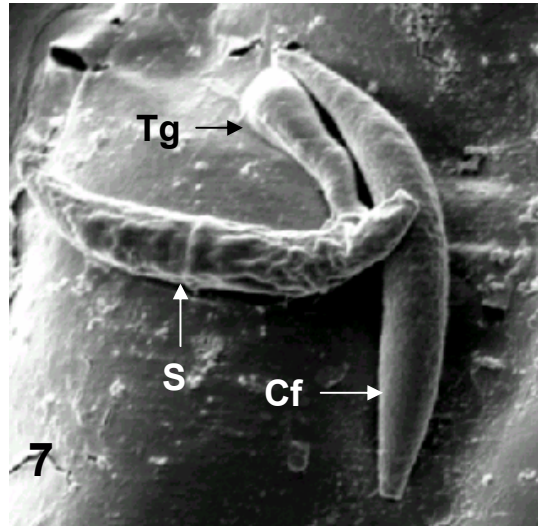


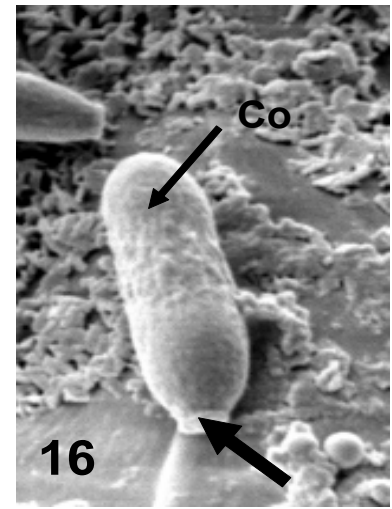
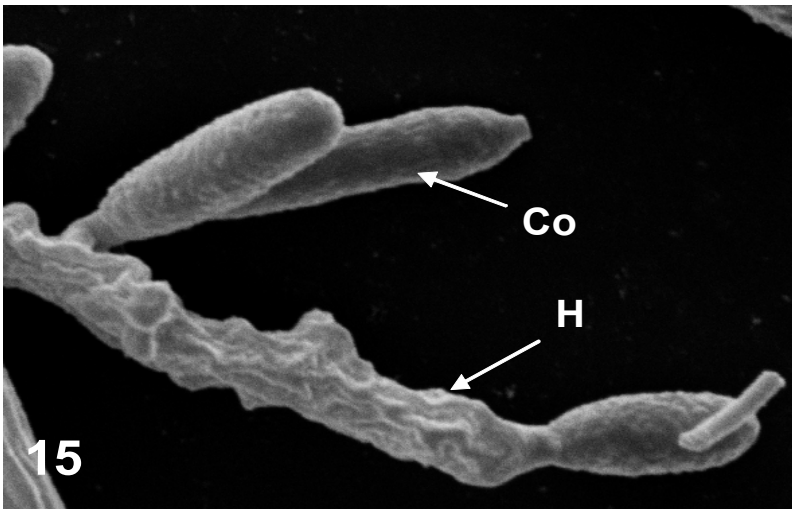
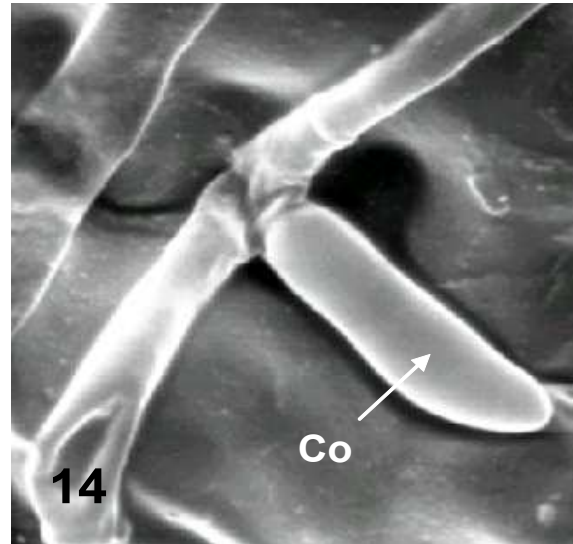
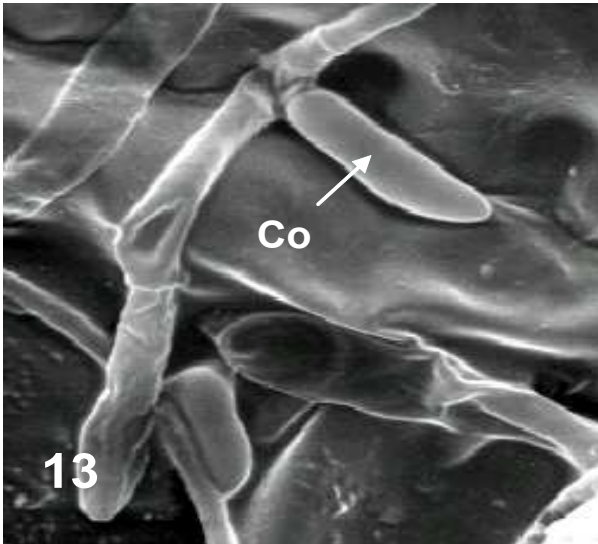
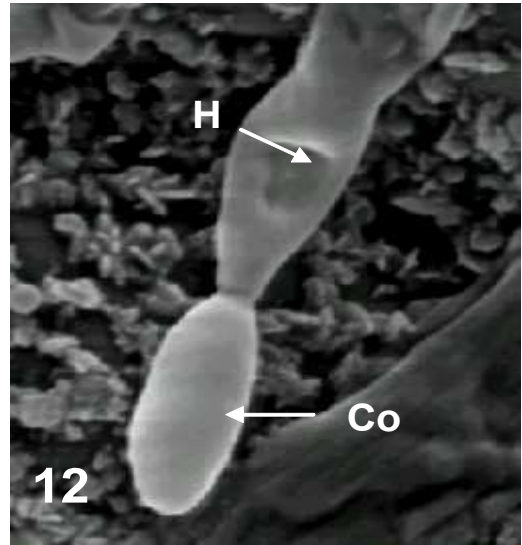
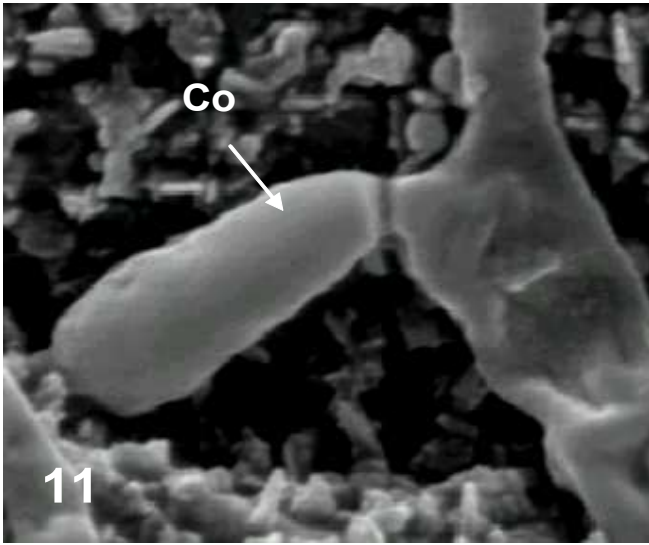
Prancha 1. Fig. 1 - 5. Microscopia de luz mostrando as hifas conidiogênicas formando conídios ovais em suas regiões laterais (Figs. 1-2 e 3) e apicais (4-5). Na Fig. 5 é possível evidenciar a condição multinucleada dos conídios ovais (seta). (escala 10 µm; aumento 400 x).

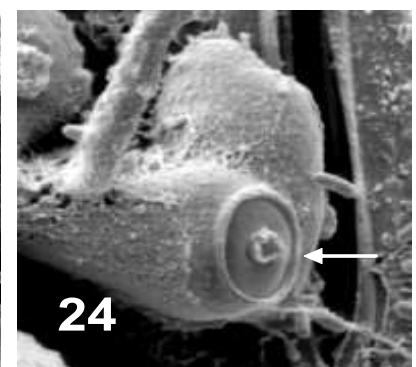
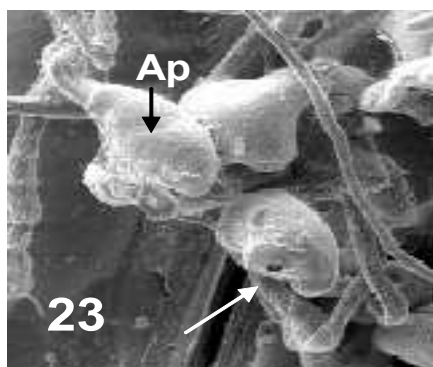
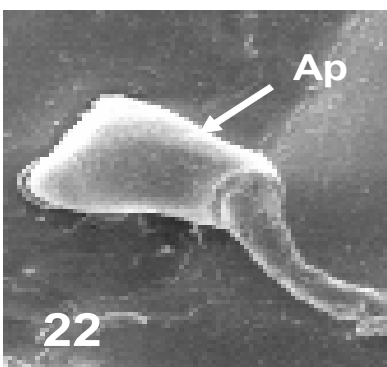
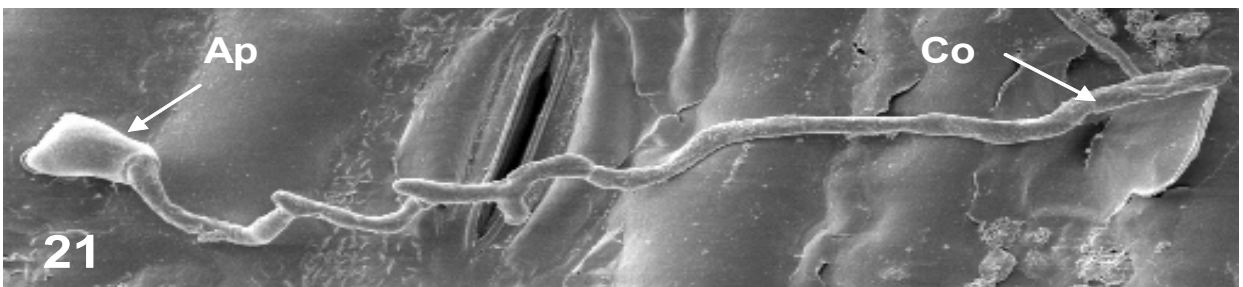
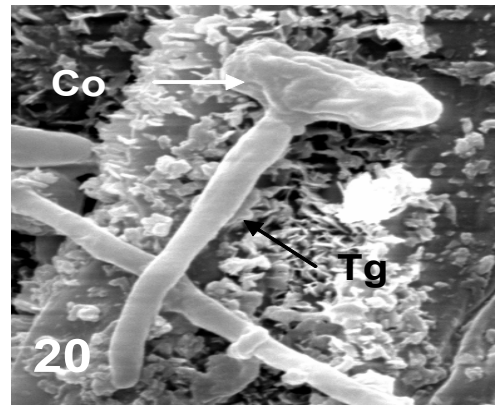
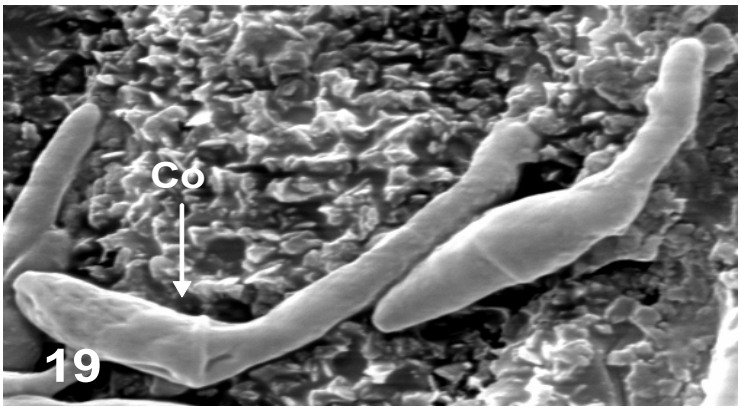
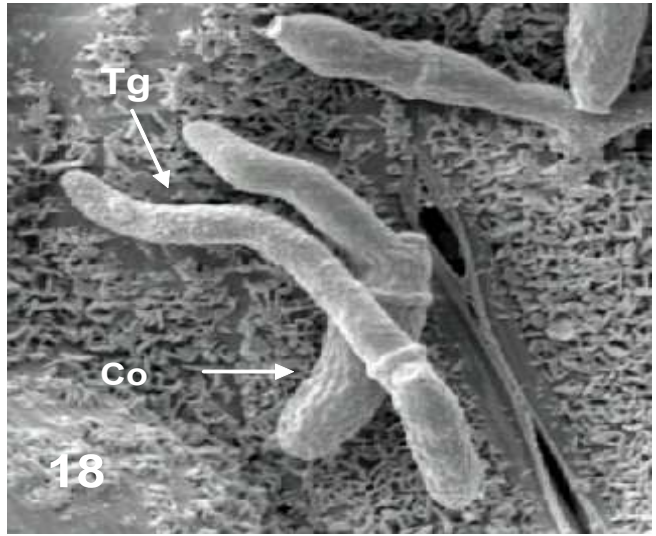
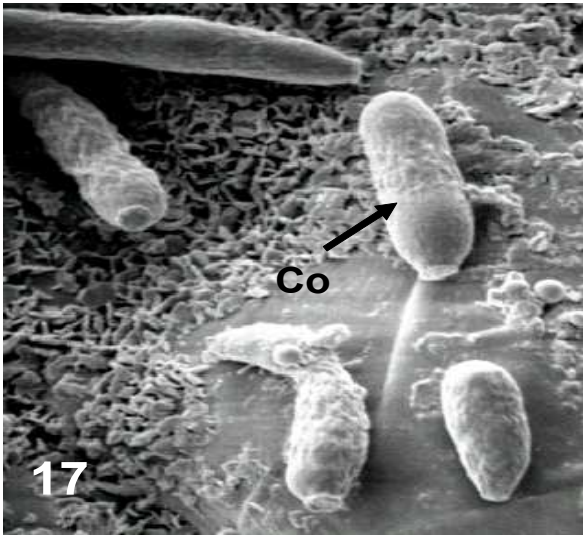
Prancha 2. Microscopia Eletrônica de Varredura de conídios de *Colletotrichum sublineolum* (Figura 6-10). Fig. 6; Conídios falcados de *C. sublineolum* não germinados (escala 5 µm; aumento 2000x). Fig. 7; Germinação de conídio falcado (Cf) com 4 horas de inoculação, mostrando a formação do tubo germinativo (Tg) e septo (S) no conídio falcado (Cf) (escala 5 µm; aumento 3000 x). Fig. 8; Formação de apressório globoso (Ap) pelo conídio falcado (Cf) após 24h de inoculação (escala 5 µm; aumento 2000 x). Fig. 9 - 10; Micélio denso formado sobre a folha de sorgo após 32 horas de inoculação oriundo da germinação de conídios falcados, onde pode ser observada a formação de conídios ovais (Co). Alguns destes conídios encontram-se em processo de germinação (Fig. 9: escala 20 µm; aumento 550 x). (Fig. 10: escala 10 µm; aumento 1750 x).

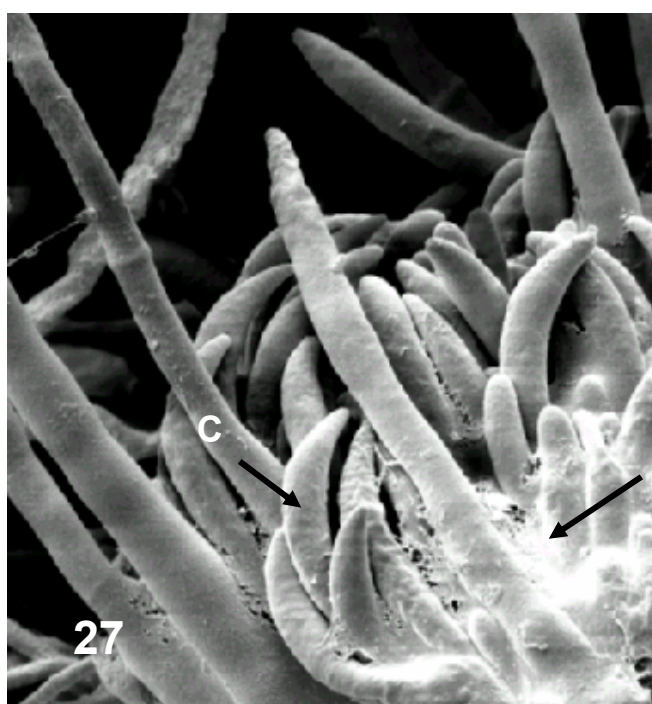
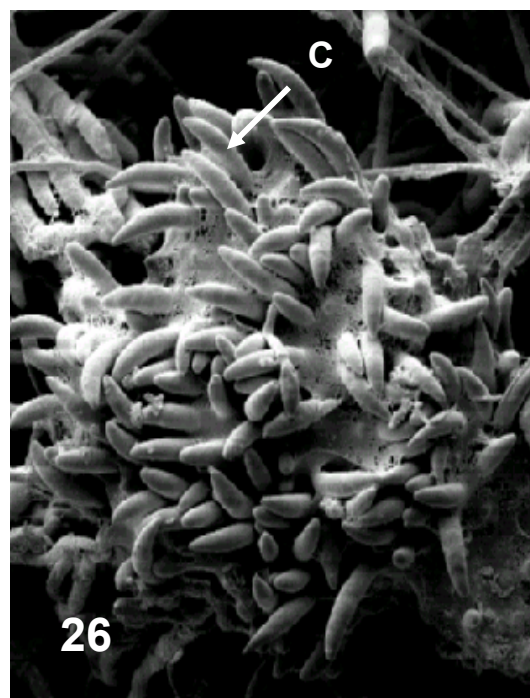
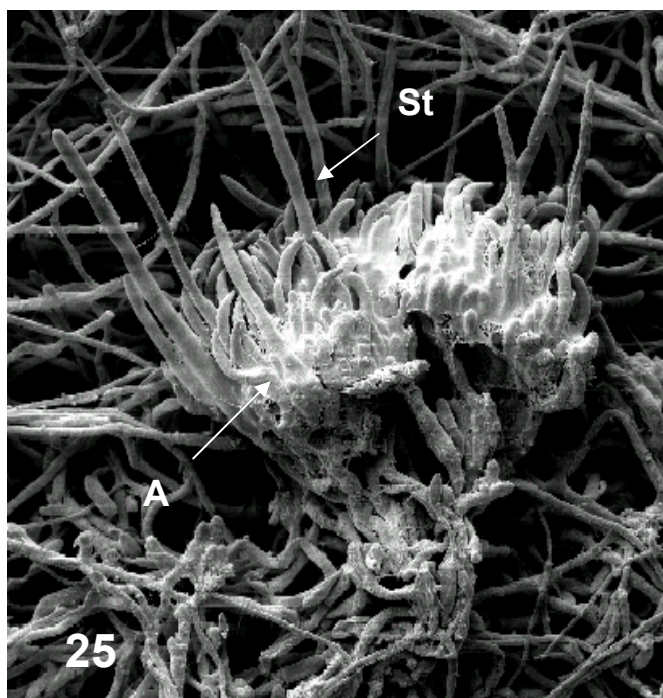
Prancha 3. Estádios de desenvolvimento de conídios ovais (Co) de *C. sublineolum* (Figs. 11-16). Após um período de 24 horas de inoculação, o micélio formado a partir de conídios falcados deram origem aos conídios ovais os quais são formados nas regiões laterais e apicais de hifas conidiogênicas (H) (Fig. 11-15) (aumento 5000 x). Fig 16; Conídio oval (Co) onde é possível evidenciar o ponto de separação do conídio com a hifa (seta) (escala 5 µm; aumento 3000 x).

Prancha 4. Germinação e penetração de conídios ovais de *C. sublineolum* sobre folhas de sorgo (Figs 17-24). Fig. 17; Conídios ovais (Co) não germinados. (escala 5 µm; aumento 3000 x). Fig. 18 - 20; Conídios ovais (Co) germinados após 4 horas de inoculação evidenciando a presença de tubo germinativo (Tg) nas laterais e extremidades do conídio e septação (S) dos conídios (Fig. 18: escala 5 µm; aumento 3000 x; Fig. 19: escala 5 µm; aumento 3300 x; Fig. 20: escala 5 µm; aumento 3500 x); Fig. 21-22; Formação do apressório (Ap) sobre a superfície da folha (escala 11 mm; aumento 850 x) após 24 horas de germinação. Fig. 23-24; Visualização do poro de penetração no apressório (Ap) (seta) (Fig. 23: escala 11 mm; aumento 850 x; Fig. 24: escala 12 mm; aumento 1000 x).









Prancha 5. Figs. 25 – 27; Micélio proveniente da germinação de conídios ovais originando acérvulos (Ac) contendo setas (St) com conídios falcados envoltos por mucilagem (seta) (Fig. 25: escala 12 mm; aumento 500 x; Fig. 26: escala 12 mm; aumento 1000 x; Fig. 27: escala 12 mm; aumento 2000 x).

4. 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAILEY, J. A.; O'CONNEL, R. J.; PRING, R. J.; NASCH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J. A.; Jeger, M. J. ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford: CAB International, 1992. p. 88-120.

CASELA, C. R.; FERREIRA, A. S.; SANTOS, F. G. Differences in competitive ability among races of *Colletotrichum graminicola* in mixtures. ***Fitopatologia Brasileira***, v. 26, p. 217-219. 2001.

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

MERCURE, E. W.; KUNOH, H.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of *Colletotrichum graminicola* conidia to corn leaves: a requirement for disease development. ***Physiological and Molecular Plant Pathology***, v. 45, p. 407-720, 1994.

MIMS, C. W.; RICHARDSON, E. A.; CLAY, R. P.; NICHOLSON, R. L. Ultrastructure of conidia and the conidium aging process in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum graminicola*. ***International Journal of Plant Sciences***, v. 156, p. 9-18, 1995.

MIMS, C. W.; VAILLANCOURT, L. J. Ultrastructural characterization of infection and colonization of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*, and by a *C. graminicola* pathogenicity mutant. ***Genetics and Resistance***, v. 92, p.803-812, 2002.

NISHIHARA, N. Two types of conidia of *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. formed on artificial media and their pathogenicity. **Annual Phytopathology Society Japan**, v. 41, p. 171-175, 1975.

PANACCIONE, D. G.; VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**. v. 81, p. 875-882, 1989.

POLITIS, D. J.; WHEELER, H. Ultrastructural study of penetration of maize leaves by *Colletotrichum graminicola*. **Physiological Plant Pathology**, v.3, p.465-471, 1973.

POLITIS, D. J. Ultrastructure penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. **Physiological Plant Pathology**, v. 8, p. 117-122, 1976.

ROBERTS, R. G.; SNOW, J. P. Histopathology of cotton boll rot caused by *Colletotrichum capsici*. **Phytopathology**, v. 74, p. 390-397, 1984.

SHERRIFF, C.; WHELAN, M. J.; ARNOLD, G. M.; BAILEY, J. A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, v.99, p. 475-478. 1995.

SOUZA-PACCOLA, E. A.; FAVARO, L. C. L.; BOMFETI, C. A.; MESQUITA, S. F. P.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Cultural characterization and conidial dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*. **Journal Phytopathology**, v. 151, p.383 – 388, 2003.

SUTTON, B. C. The appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum falcatum*. **Canadian Journal of Botany**, v. 46, p. 873-876, 1968.

SUTTON, B. C. **The Coelomycetes**. Kew, London: Commonwealth Mycological Institute. p.696.1980.

VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella (Colletotrichum)* isolates from maize and from sorghum. **Experimental Mycology**, v. 16, p. 219-229, 1992.

YANG, Z.; PANACCIONE, D. G.; HANAU, R. M. Gene expression associated with light-induced conidiation in *Colletotrichum graminicola*. **Canadian Journal Microbiology**, v.37, p.165-167. 1991.

WARREN, H. L. Leaf anthracnose. In: Frederiksen, R. A. **Compendium of Sorghum Diseases**. St. Paul: American Phytopathological Society. 1986. p. 10-11.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M. A cytological study of compatible and incompatible interactions between *Sorghum bicolor* and *Colletotrichum sublineolum*. **New Phytologist**, v. 134, p.25-34. 1996.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O'CONNELL, R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v. 91, p.149-158. 2001.

5. DIMORFISMO CONIDIAL EM *Colletotrichum sublineolum*: UM ESTUDO CITOLÓGICO COMPARATIVO DO PROCESSO DE INFECÇÃO

5. 1. RESUMO

Estudos citológicos foram conduzidos sobre o processo de infecção de conídios falcado e oval de dois isolados BR 204.01 e BR 8502 de *Colletotrichum sublineolum* sobre folhas de sorgo de cultivares suscetíveis, moderadamente suscetíveis e resistentes. Conídios falcado e oval de cada isolado foram inoculados, separadamente sobre as folhas destacadas. O processo de infecção foi investigado através da microscopia de luz de 2 a 168 h após inoculação (AI). A germinação de conídios tanto dos ovais como dos falcados teve início a partir de 2h AI em todos os cultivares avaliados e aumentou com o tempo. Com 4 horas AI, tanto conídios ovais como falcados oriundos do isolado BR 204.01 deram início ao processo de formação do apressório. Já conídios ovais oriundos do isolado BR 8502, iniciaram este processo 6 h AI. Neste isolado, à semelhança do isolado BR 204.01, conídios falcados produziram estas estruturas 4 horas AI. A frequência de formação de apressórios entre os cultivares variou entre os diferentes tempos de incubação para os dois isolados fúngicos, porém após 24 horas essas diferenças não mais foram detectadas de forma que, tanto conídios ovais como falcados formaram apressórios em igual frequência, independente do nível de resistência do cultivar. O tempo necessário para a formação do poro de penetração variou entre os dois tipos de conídios, entre os isolados fúngicos e entre os cultivares. Poros de penetração foram visualizados 8 h AI de conídios falcados nos segmentos foliares de cultivares suscetíveis. Nos demais cultivares e no outro isolado fúngico esta estrutura foi formada 10 h AI, tanto no conídio oval como no falcado. As hifas de infecção foram produzidas no interior de células epidérmicas do tecido vegetal inicialmente 24h AI, por ambos os isolados fúngicos independente da resistência ou suscetibilidade das cultivares porém conídios falcados produzem hifas de penetração em proporção superior a dos conídios ovais. Vesículas de infecção são formadas nas células epidérmicas do hospedeiro, abaixo dos apressórios oriundos tanto da germinação de conídios falcado quanto de oval. Conídios ovais mostraram-se infectivos e capazes de completar o ciclo da doença, da mesma maneira que os conídios falcados, porém ainda permanece desconhecido o verdadeiro papel biológico destes conídios no processo de estabelecimento e disseminação da doença.

Palavras-chave: Conídios ovais, conídios falcados, *Sorghum bicolor*, interação patógeno-hospedeiro.

CONIDIAL DIMORPHISM IN *Colletotrichum sublineolum*: A COMPARATIVE CYTOLOGICAL STUDY OF THE INFECTION PROCESS.

5. 2. ABSTRACT

Cytological studies were conducted on the infection process of falcate and oval conidia of two isolates, BR 204.01 and BR 8502, of *Colletotrichum sublineolum* on sorghum leaves of susceptible, moderately susceptible and resistant cultivars. Falcate and oval conidia of each isolate were inoculated, separately, on detached leaves. The process of infection was investigated through light microscopy from 2 to 168 hours after inoculation (AI). The germination of oval, as well as falcate conidia began 2 hours AI in all the evaluated cultivars and increased with time. Four hours after inoculation, oval and falcate conidia from the isolate BR 204.01 began the appressorium formation process. However, oval conidia from the isolate BR 8502 initiated this process 6 hours AI. In this isolate, similarly to the isolate BR 204.01, falcate conidia produced these structures after 4 hours of incubation. The frequency of appressoria formation between the cultivars varied among the different incubation times for both fungal isolates, but after 24 hours, these differences were no longer detected, so that oval and falcate conidia formed appressoria with equal frequencies, independent of the level of resistance of the cultivar. The time needed for the formation of the penetration pore varied between both types of conidia, between the fungal isolates and between cultivars. Penetration pores were visualized 8 hours AI of falcate conidia in foliar segments of susceptible cultivars. In the other cultivars and in the other fungal isolate, this structure was formed 10 hours AI of the oval and falcate conidia. The infection hyphae were produced in the interior of epidermal cells of the plant tissue, initially 24 hours AI, by both fungal isolates independent of resistance or susceptibility of the cultivars, but falcate conidia produced penetration hyphae in a superior proportion to oval conidia. Infection vesicles are formed in the epidermal cells of the host, under the appressoria formed from the germination of either falcate or oval conidia. Oval conidia were infective and capable of completing the disease cycle, in the same manner as falcate conidia, but the true biological role of these conidia in the process of establishing and disseminating the disease is still unknown.

Key words: Oval conidia, falcate conidia, *Sorghum bicolor*, pathogen-host interaction.

5. 3. INTRODUÇÃO

A antracnose é uma das mais importantes doenças do sorgo (*Sorghum bicolor*) no Brasil, representando um sério problema à cultura em regiões quentes e úmidas, embora perdas severas possam também ocorrer em áreas sujeitas a breves períodos de chuva seguida de seca prolongada (Frederiksen *et al.*, 1995). O agente causal da antracnose sobre cereais incluindo milho e sorgo, foi muito estudado como *Colletotrichum graminicola* (Holliday, 1980). Entretanto análises de seqüências de DNA ribossômico, DNA fingerprinting, testes de cruzamentos e morfologia do apressório tem demonstrado claramente que isolados do milho e sorgo pertencem a espécies diferentes (Sherriff *et al.*, 1995; Sutton, 1968; Vaillancourt e Hanau, 1992). Isolados do milho são agora considerados *C. graminicola*, enquanto que os de sorgo são considerados *C. sublineolum* (Sutton, 1980). Em estudos prévios de caracterização cultural Souza-Paccola *et al.* (2003), demonstraram que isolados de *C. sublineolum* apresentavam dimorfismo conidial produzindo, além dos conídios falcados formados em acérvulos, um segundo tipo de conídio, o conídio oval. Este apresenta forma oval, de tamanho menor que o falcado e é produzido em cultura líquida.

Durante a colonização em plantas hospedeiras, fungos patogênicos exibem dois modelos principais de nutrição: biotrófico, onde nutrientes são obtidos de células vivas do hospedeiro, e necrotrófico, onde os nutrientes são obtidos de células do hospedeiro mortas pelo fungo (Thrower, 1966). Espécies de *Colletotrichum* usam diversas estratégias para invadir o tecido hospedeiro, variando de hemibiotrófico intracelular a necrotrófico subcuticular, por meio de estruturas especializadas, incluindo tubo germinativo, apressório, hifas intracelulares e hifas secundárias necrotróficas, fornecendo assim excelentes modelos para estudos celulares e moleculares no processo de interação planta - patógeno (Bailey *et al.*, 1992; Perfect *et al.*, 1999).

Wharton e Julian (1996) verificaram a importância da fase inicial biotrófica na colonização do sorgo por *C. sublineolum* e Wharton *et al.* (2001), acompanharam este mesmo processo de infecção através de microscopia eletrônica de transmissão em cultivares suscetível e resistente.

Por serem escassas as informações sobre o verdadeiro papel dos conídios ovais na planta, o propósito deste trabalho foi examinar as etapas do processo de infecção de conídio falcado e oval de *C. sublineolum* sobre cultivares suscetível e resistente de sorgo para determinar (i) se o processo de infecção difere entre os dois conídios e (ii) a reação dos cultivares frente à colonização dos conídios.

5. 4. MATERIAL E MÉTODOS

5. 4. 1. Cultivo das Plantas de Sorgo

As sementes de cultivares de sorgo utilizadas como diferenciadoras (Tabela1) foram cedidas pelo EMBRAPA Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG /Brasil.

As sementes dos cultivares germinaram em vasos de cerâmica de 23 cm de diâmetro por 30 cm de altura. Foi adicionado 14 g do adubo NPK (Nitrogênio 10%; Potássio 10%; Fósforo 10%) por vaso no quinto dia após a semeadura. As plantas desenvolveram-se em casa de vegetação durante 25 dias. Após este período as folhas foram destacadas das plantas e levadas ao laboratório para os procedimentos de inoculação.

Tabela 1. Cultivares de sorgo com suas respectivas reações de resistência.

Cultivares	Reação de resistência
BR005	Resistente
BR 008	Resistente
BR 009	Suscetível
CMSXS210	Moderadamente suscetível
SC283	Resistente

Uma vez destacadas, as folhas foram lavadas com água destilada e sabão neutro e cortadas com estilete esterilizado. Foram recortados 512 segmentos foliares medindo aproximadamente 1,5 x 1,5 cm. Duas camadas de papel de filtro autoclavados (8 cm de diâmetro) foram depositadas em placas de Petri esterilizadas.

Água destilada esterilizada (1,6 mL) foi adicionada em cada placa para umedecer o papel de filtro. Os segmentos foliares foram então colocados sobre o papel de filtro umedecido, com a superfície adaxial voltada para cima.

5. 4. 2. Obtenção e Inoculação dos Conídios

Colletotrichum sublineolum, isolado BR 204.01 e BR 85.02, foram cedidos pela Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas, MG/ Brasil. Para obtenção de conídio falcado, os isolados foram cultivados em meio farinha de aveia-ágar, sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à temperatura de $22 \pm 3^\circ \text{C}$, durante 6 dias. A produção de conídio falcado foi induzida pelo método mecânico de raspagem do micélio com auxílio de uma lâmina de metal. As culturas assim injuriadas foram novamente incubadas nas mesmas condições de cultivo. Após 13 dias de inoculação, foi adicionado às placas contendo o fungo em desenvolvimento 9 mL de solução salina 0,85% acrescida de 2,5 mL de solução Tween 80 0,01% em água, sendo em seguida feita uma raspagem superficial com alça de Drigalski para liberação dos conídios falcados.

Para produção de conídio oval, três discos de 10 mm de diâmetro, contendo micélio dos isolados de *C. sublineolum*, foram usados para inocular 50 mL de meio BD (Batata Dextrose). A cultura foi mantida sob agitação (60 rpm) por 4 dias a $22 \pm 3^\circ \text{C}$ sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E/m}^2/\text{s}$) e, posteriormente filtrada em gase. O filtrado foi centrifugado a 6000g por 5 min para recuperação dos conídios ovais. O pellet contendo os conídios ovais foi ressuspensionado em 2 mL de solução de 0,01% Tween 80 em água. O número de conídios falcados e ovais foi estimado em Câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e a concentração final ajustada para 3×10^6 conídios mL^{-1} . Separadamente, as suspensões dos inóculos foram colocadas em pequenos

borrifadores e 0,02 mL foi borrifado uniformemente nos segmentos foliares depositados em cada placa de Petri. As placas foram incubadas à 23 °C sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Em cada tratamento foram feitas quatro repetições.

5. 4. 3. Coloração

As observações foram realizadas em intervalos de 2 h até 10 h após inoculação (AI), em seguida em intervalos de 24 h até 168 h AI e duas semanas após as 168 h. Os segmentos foliares foram clarificados em 1,5 mL de álcool acético (1 parte de ácido acético glacial e 3 partes de etanol 95%) por 48 h (Busch e Walker 1958; Khan e Hsiang 2003). Após 24 h, substituiu-se a solução de álcool acético por uma nova solução e assim mantida por mais 24 h. As folhas clarificadas foram removidas e colocadas por 5 minutos em uma solução de 0,05% de Trypan blue (w/v) em lactofenol (20% fenol, 20% ácido láctico, 40% glicerina e 20% de água destilada). Após a coloração as folhas foram depositadas sobre lâminas com a superfície adaxial voltada para cima e então adicionada à lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas em Fotomicroscópio AXIOPHOT Zeiss.

5. 4. 4. Estruturas de Infecção

O processo de germinação de conídios foi avaliado nas preparações de 2 a 48 h AI. Em cada segmento foliar, 25 conídios foram observados quanto a emissão do tubo germinativo nos tempos determinados. Um conídio foi considerado germinado quando seu tubo germinativo apresentou pelo menos 50% da largura do conídio.

A formação do apressório e do poro de penetração foram observados sobre as preparações de 4 à 48h AI. Em cada segmento foliar verificou-se a presença de apressório nos primeiros 25 conídios visualizados, germinados ou não. Apressórios originados a partir de fragmentos de micélio foram desconsiderados. A formação do poro de penetração foi observada através da formação de um ponto claro e redondo no interior do apressório, visto pela microscopia de luz.

A ocorrência da hifa de infecção foi avaliada nas preparações de 10, 24, 48, 72, 96 e 120 h AI. Em cada segmento foliar a presença da hifa de infecção foi avaliada em 25 conídios. A penetração foi considerada bem sucedida quando o apressório produziu hifa no interior das células epidérmicas foliares.

As preparações de 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h AI foram usadas para avaliar a presença de acérvulos e produção de conídios. Duas semanas após a inoculação avaliou-se também o número de acérvulos sobre o segmento foliar.

5. 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. 5. 1. Germinação de Conídios

O processo de germinação tanto dos conídios ovais como dos falcados teve início a partir de 2 h após a inoculação (AI) em todos as cultivares avaliadas e a frequência deste processo aumentou com o tempo de incubação. Transcorridas 48 horas da inoculação, a porcentagem de germinação de ambos os conídios não diferiu para o isolado BR 204.01, no entanto para o isolado BR 8502 esta taxa foi ligeiramente maior para os conídios falcados (Tabela1).

Conídios ovais oriundos do isolado BR 8502 apresentam nas primeiras horas de incubação uma taxa de germinação significativamente superior aos conídios falcados, porém a partir de 6 horas de incubação a taxa de germinação destes últimos superou à dos conídios ovais. Em 48 h AI, nos dois isolados testados, conídios ovais germinaram em frequência acima de 95%, enquanto que nos conídios falcados esta frequência foi de 99% (Tabela 1).

Apesar das cultivares apresentarem diferenças nas reações de resistência e suscetibilidade a taxa de germinação dos conídios, após 48 horas de incubação, não mostrou diferenças significativas entre eles, para ambos os isolados.

Conídios falcados podem formar um ou dois tubos germinativos, um na extremidade do conídio e outro na lateral deste (Fig. 1A e 1B). Somente após 96 horas de inoculação, pode ser observada a formação do septo central (Fig. 1A). Já os conídios ovais formam apenas um tubo germinativo na extremidade do conídio (Fig. 2B e 2C).

Segundo Nicholson e Epstein (1991), a adesão é considerada pré-requisito essencial durante a patogênese de fungos. As etapas de atração e contato entre patógeno e hospedeiro fazem parte da

fase de reconhecimento da interação (Leite *et al.*, 1997). Durante a pré-penetração, ocorre a adesão através da liberação de materiais adesivos produzidos pelo patógeno. A penetração e a infecção somente serão atingidas se houver adesão adequada (Leite *et al.*, 2001) para assim estabelecer as relações parasitárias estáveis entre fungo e planta (Amorim, 1995). Evidências em várias espécies de *Colletotrichum* indicam que a rápida adesão inicial de conídios não germinados envolve interações hidrofóbicas. Em *C. musae* e *C. graminicola*, enzimas localizadas nas superfícies protéicas das células do hospedeiro podem impedir a adesão de conídios não germinados, sugerindo que a superfície protéica de células pode mediar este processo (Mercure *et al.*, 1994; Sela-Buurlage *et al.*, 1991).

Mercure *et al.* (1994), observaram que conídios de *C. graminicola*, fixam-se às folhas de milho após alguns minutos de contato e a germinação destes conídios tem início 6h após a inoculação. Alterações nos conídios e presença de material adesivo sobre a superfície de contato tanto de conídios não germinados como nos tubos germinativos podem ser visualizadas. A microscopia eletrônica de varredura e a microscopia de luz revelaram que os materiais envolvidos na adesão são de natureza glicoproteica.

5. 5. 2. Formação e Morfologia do Apressório

O tempo necessário para a formação do apressório variou entre os dois tipos de conídios dependendo do isolado. Após 4 horas de incubação, tanto conídios ovais como falcados oriundos do isolado BR 204.01 deram início ao processo de formação do apressório. Já conídios ovais oriundos do isolado BR 8502, iniciaram este processo 6 h AI. Neste isolado, à semelhança

do isolado BR 204.01, conídios falcados produziram estas estruturas após 4 horas de incubação (Tabela 2).

A frequência de formação de apressórios entre as cultivares variou nos diferentes tempos de incubação para os dois isolados fúngicos, porém após 24 horas essas diferenças não mais foram detectadas de forma que, tanto conídios ovais como falcados formaram apressórios com igual frequência, independente do nível de resistência da cultivar (Tabela 2).

Apressórios provenientes de conídios falcados foram produzidos diretamente nos conídios (Fig. 1A – 1G) enquanto que nos conídios ovais estes se formaram a partir de tubos germinativos (Fig. 2D, 2E e 2F).

Apressórios oriundos de conídios falcados apresentaram forma arredondada com a superfície lisa (Fig. 3A e 3B) enquanto que apressórios de conídios ovais apresentaram-se ligeiramente irregulares (Fig. 3C – 3G). Em conídios ovais os apressórios intumescem e são separados do tubo germinativo por meio de um septo (Fig. 3F). Apressórios jovens de ambos os conídios são hialinos, e as paredes tornam-se mais espessas e escuras com o acúmulo de melanina durante o processo de maturação.

O apressório desenvolve-se sobre a superfície foliar quando o tubo germinativo cessa seu crescimento e sua extremidade sofre uma dilatação, tornando-se delimitado por um septo. A maturação do apressório envolve a formação do poro de penetração na base da célula, deposição de uma nova camada de parede e a secreção de material da matrix extracelular e finalmente a fixação do apressório na superfície do hospedeiro (Pain *et al.*, 1996). Subseqüentemente, a melanina é depositada na camada da parede celular perto da membrana plasmática (Kubo e Furusawa, 1986).

Browning *et al.* (1999), e Khan e Hsiang (2003), descreveram apressórios de conídios falcados de *C. graminicola* em *Agrostis palustris* e *Poa annua*. Estes variaram morfológicamente de redondos a ovalados e lobulados. Como observado por Browning *et al.* (1999), o apressório de isolados de gramíneas apresentaram grande similaridade com apressórios de isolados de sorgo. Estes foram descritos por Sutton (1968) como piriformes, elípticos, ovalados a claviforme. Apressórios provenientes de isolados de milho, foram descritos por este mesmo autor com forma mais variada, círculo ovalado, pequeno, piriforme a elíptico, completamente irregular e podendo apresentar de um a cinco lóbulos distintos.

A morfologia do apressório maduro de uma determinada espécie é razoavelmente constante, permitindo classifica-lo como globoso (= ovalado) ou subgloboso (= obovado) e de contorno regular ou com variados graus e frequência de rugosidades (Lenné, 1978 apud Lopez, 2001).

5. 5. 3. Poro de penetração, hifas de infecção e acérvulos

Na microscopia de luz, o poro de penetração aparece como um ponto claro pequeno e circular no centro do apressório (Fig. 1D; 2F; 3A – 3G), e é no poro que se forma o peg de penetração, uma estrutura pequena e embutida na parede celular que dificilmente pode ser visualizada pela microscopia de luz.

O poro de penetração foi observado após 8 h de inoculado apenas em segmentos foliares do cultivar suscetível BR009 e moderadamente suscetível CMSXS210, inoculados com conídios falcado do isolado BR 204.01 (Tabela 3). Nos demais cultivares e no

outro isolado fúngico esta estrutura foi formada após 10 horas da inoculação, tanto com conídio oval quanto no falcado.

Os resultados não permitiram correlacionar suscetibilidade do cultivar com frequência de formação do poro de penetração.

Passadas 48 h AI, 79,5% dos conídios do isolado BR 204.01 inoculados na cultivar resistente BR005 formaram os poros de penetração, enquanto que nos demais cultivares esta frequência variou de 33,5 a 45,5%. Neste mesmo tempo de incubação, 58% dos conídios do isolado BR 8502 inoculado sobre folhas do cultivar suscetível, BR009, formaram poros de penetração, enquanto que nos demais cultivares essa frequência variou de 31 a 43% (Tabela 3).

Apressórios originados de conídios ovais de ambos os isolados fúngicos, iniciaram o processo de formação de poros de penetração 10h AI em uma frequência relativamente baixa, em torno de 2,6%. No entanto esta frequência aumentou significativamente a partir de 24h AI chegando a 47,6% com 48h AI, não diferindo dos conídios falcados para o isolado BR 204.01, e 45,0% para o isolado BR 8502, frequência maior que em conídios falcados.

Outra forma de penetração de hifas no tecido foliar do hospedeiro seria através das aberturas naturais, como estômatos, sem a necessidade de formação de poros de penetração. Esse tipo de penetração não foi aqui observado.

As primeiras hifas de infecção ocorrendo no interior de células epidérmicas do tecido vegetal foram observadas com 24h AI, tanto no isolado BR 204.01 como no BR 8502 em todas as cultivares (Tabela 4). Com 48h AI, em torno de 45,5% dos conídios oriundos do isolado BR 204.01 formaram hifas de infecção na cultivar resistente BR005, enquanto que a frequência destas estruturas nas demais cultivares foi significativamente menor, variando de 19 a 32%.

Transcorridas 120 h AI, esta frequência subiu para 84% e 93% nas cultivares resistentes BR005 e SC 283, respectivamente, e 77% no cultivar moderadamente resistente, CMSXS210. O BR 8502 teve comportamento diferente para esta característica. Com 48h AI 42,5% dos conídios inoculados na cultivar suscetível BR009 apresentaram hifas de penetração, enquanto que nas demais cultivares esta frequência variou de 8,5% a 17%. A frequência de formação das hifas de penetração após 120h AI foi semelhante em todas as cultivares independente da reação de resistência e de suscetibilidade de cada um (Tabela 4).

No isolado BR 204.01, hifas de infecção foram formadas em maior porcentagem pelos conídios falcados do que pelos conídios ovais em todos os intervalos de tempo avaliados. O isolado BR 8502 apresentou comportamento diferente, uma maior porcentagem destas hifas formadas pelos conídios falcados foi verificada somente a partir de 72h AI permanecendo em frequência superior mesmo após 120h AI.

Os resultados permitiram concluir que conídios falcados produzem hifas de penetração em proporção superior aos conídios ovais (Tabela 4).

Fungos patogênicos após formação do apressório, penetram em plantas através do poro apressorial, uma zona fina e circular na base do apressório a qual não é melanizada. As hifas de infecção emergem pelo poro e penetra pela parede celular do hospedeiro. Então a vesícula de infecção é formada, a qual caracteriza o crescimento biotrófico por um período curto. A vesícula de infecção não atravessa a membrana plasmática do hospedeiro, mas a membrana plasmática invagina-se ao redor dela. Esta forma de crescimento proporciona um aumento da área de superfície do fungo, permitindo maior acesso aos nutrientes do hospedeiro (Bergstrom e Nicholson, 2000).

Vesículas de infecção, resultantes da germinação dos conídios falcados, foram formadas abaixo das células epidérmicas do tecido hospedeiro (Fig. 4A e 4B). Apressórios, vesículas e hifas de infecção formadas a partir do processo de germinação dos conídios ovais podem ser visualizadas nas Figuras 4D e 4E. A Figura 4E permite observar a formação de conídios ovais na extremidade das hifas de infecção no interior das células epidérmicas do sorgo.

Panaccione *et al.* (1989) sugerem que a função dos conídios ovais produzidos durante o processo de necrose em milho por *C. graminicola* seja o de disseminação dentro da planta.

Embora esta função não tenha sido aqui completamente determinada, a ocorrência da formação destes conídios no interior das células epidérmicas (Fig. 4E) sugere que o possível papel destes conídios como agente disseminador da doença na planta.

Wharton *et al.* (2001), através de observações ultraestruturais do processo de infecção de conídios falcados de *C. sublineolum* verificaram que os eventos iniciais de penetração foram os mesmos tanto em cultivares de sorgo suscetíveis como nos resistentes. Tubos germinativos originados da germinação de conídios falcados formaram apressórios melanizados e globosos que penetraram diretamente nas células epiteliais do hospedeiro. A penetração foi seguida da formação de vesículas globulares biotróficas nas células epiteliais e as hifas primárias oriundas das vesículas colonizaram outras células do hospedeiro com micélios intracelulares.

Os primeiros sintomas da doença foram visualizados a partir de 72h AI nos segmentos foliares inoculados com conídios falcados de ambos os isolados (Tabela 5), com formação de lesões necrosadas seguida de formação de acérvulos no centro das mesmas.

Enquanto que nos segmentos foliares inoculados com conídios ovais, os sintomas surgiram somente a partir de 144h AI (Tabela 5).

A cultivar BR009 inoculada com o isolado BR 204.01 (Tabela 5) apresentou um número maior de acérvulos com 96h; 120h; 144h; 168h e duas semanas em relação às outras cultivares. Este mesmo cultivar inoculado com o isolado BR 8502, apresentou um número maior de acérvulos a partir de 120h, 144h e 168h AI, em relação aos tecidos foliares inoculados com conídios ovais (Tabela 5).

A Figura 5 mostra os acérvulos formados no tecido foliar no cultivar SC283 inoculado com conídios ovais do isolado BR 204.01. O processo inicia-se com a formação do estroma resultante de um acúmulo de hifas que se agregam na superfície celular (Fig 5A e 5B). Pequenos acérvulos contendo um número ainda pequeno de setas podem ser vistos a partir dos estromas (Fig 5C-5D). O número de setas aumenta com o tempo de incubação (Fig 5E). No intervalo de 144h AI é possível verificar a presença de conídios falcados em abundância sobre os acérvulos e o tecido lesionado.

Estes resultados demonstram que conídios ovais também são infectivos promovendo o desenvolvimento de lesões com acérvulos que dão origem ao conídio falcado, fechando o ciclo de infecção.

Apesar das diferenças morfológicas e ontogênicas dos conídios falcados e ovais ambos são capazes de reproduzir sintomas da doença.

Os conídios ovais emitem no início da germinação apenas um tubo germinativo, enquanto que os conídios falcados podem emitir até dois. A emissão de múltiplos tubos germinativos em *C. sublineolum* não foi visualizada como descrito por Khan e Hsiang (2003) em *C. graminicola*. Uma vez emitido o tubo germinativo inicia-se o processo de formação

do apressório. No conídio falcado este é formado a partir do próprio conídio, enquanto que no oval este é formado a partir do tubo germinativo. Uma vez formado os apressórios, em ambos os conídios, vesículas de infecção podem ser vistas de onde partem as hifas de infecção seguida da formação do estroma e exteriorização dos acérvulos contendo setas, onde os conídios falcados são ali produzidos. Conídios ovais foram produzidos internamente nas células epidérmicas, nas extremidades das hifas de infecção.

O processo geral de infecção pelos conídios ovais de *C. sublineolum* foi similar ao dos conídios falcados e semelhante a aqueles descritos por outros autores em *C. graminicola*. Conídios ovais mostraram-se infectivos e capazes de completar o ciclo da doença, porém o papel biológico destes conídios no processo de estabelecimento e disseminação da doença requer melhores investigações.

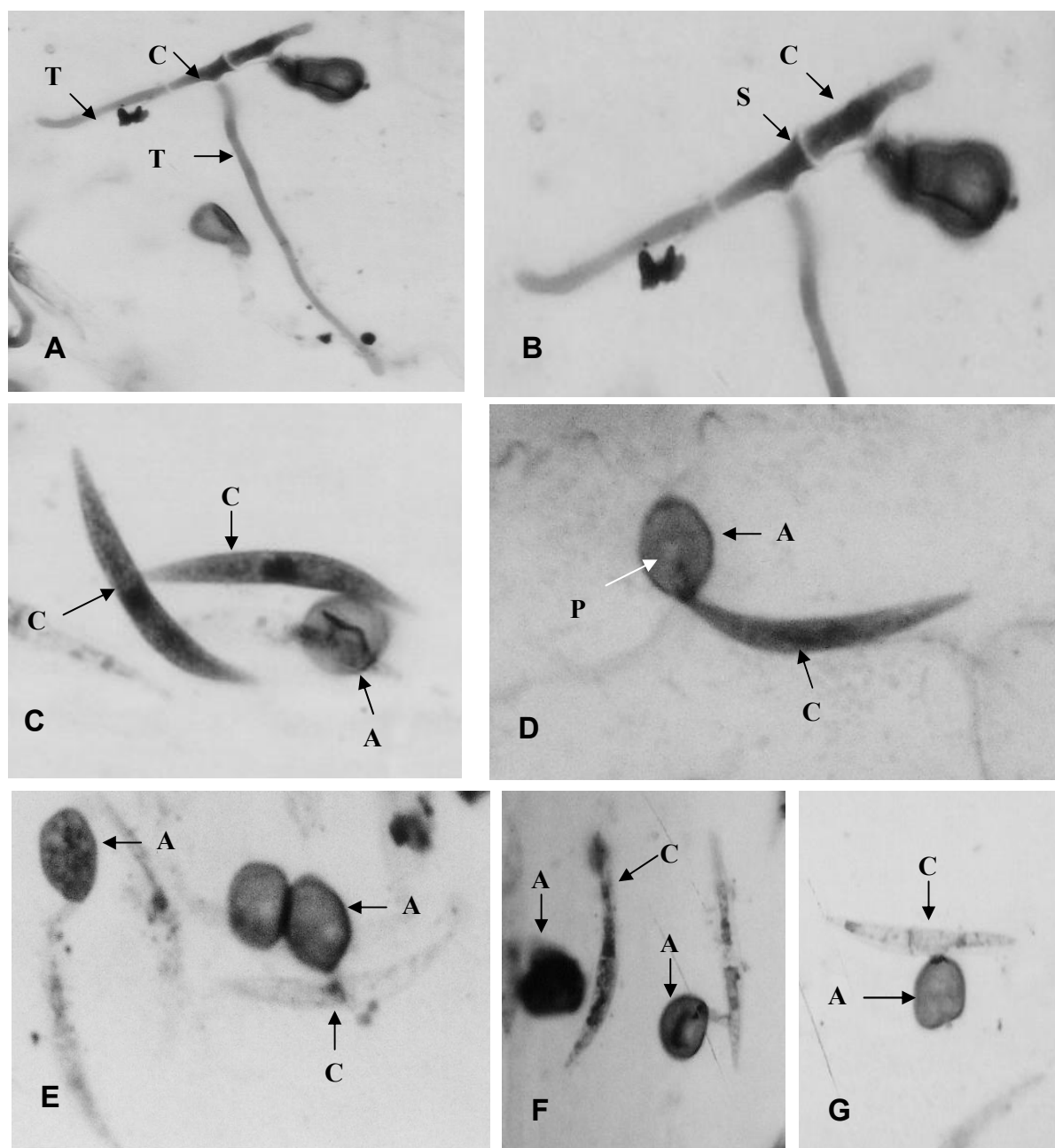


Figura 1. Fotomicrografias de tecido foliar de sorgo tratado com álcool acético e corados com Trypan blue (0,005%), demonstrando o processo de germinação de conídios falcados do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineolum* após inoculação (A – G). (A) Conídio falcado (Cf) com 96h de inoculação, apresentando dois tubos germinativos, um na extremidade do conídio e outro na lateral (escala 20 μ m); (B) Com 96 h de inoculação, conídio falcado (Cf) com septo (S) e apressório formado (escala 20 μ m); (C) Conídios falcados (Cf) após 10 h de inoculação, um não germinado e o outro com apressório (Ap) melanizado (escala 10 μ m); (D) Conídio falcado (Cf) com 10 h de inoculação com formação de apressório diretamente do conídio e apresentando poro de penetração (escala 10 μ m); (E-G) Conídios falcados (Cf) com 10 h de inoculação, com apressórios (Ap) melanizados formados (escala : (E) 20 μ m; (F) 15 μ m; (G) 10 μ m).

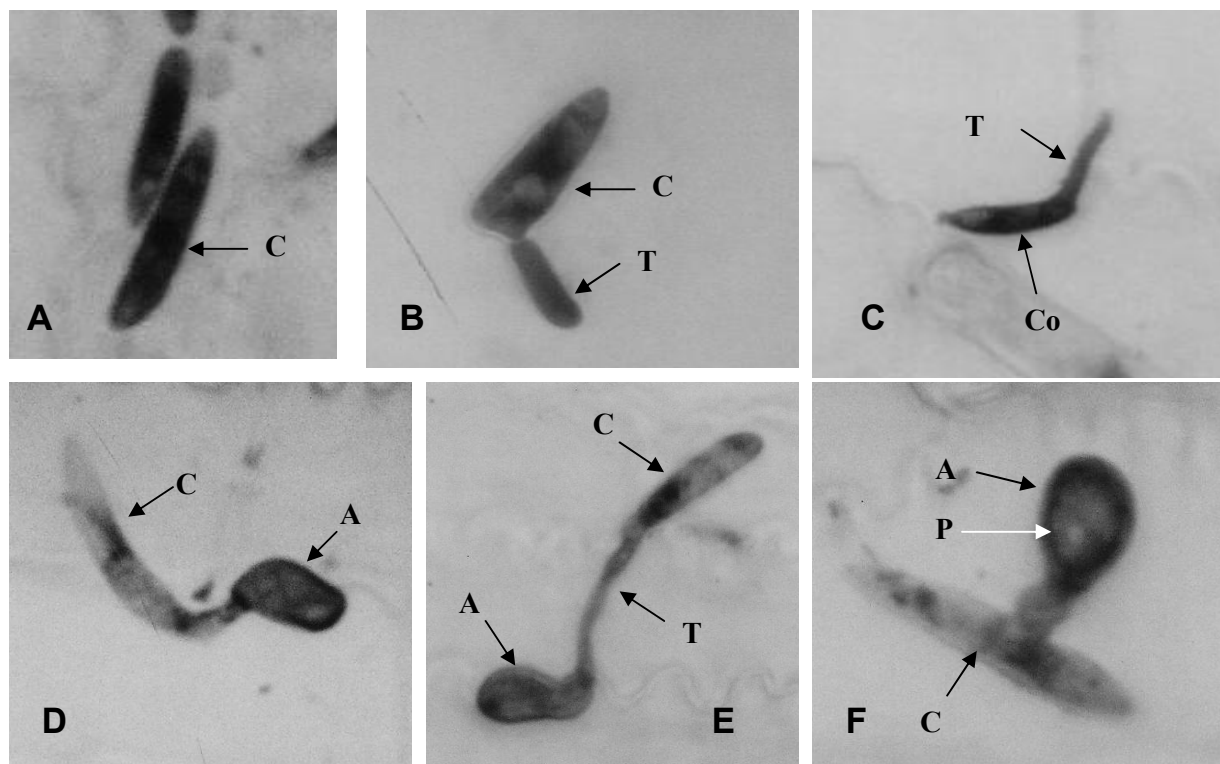


Figura 2. Germinação de conídios ovais de *Colletotrichum sublineolum* sobre tecido foliar sorgo após clarificação com álcool acético e coloração com Trypan blue (0,005%), (A) Conídios ovais (Co) com 2 h de inoculação (escala 25 μ m); (B-C) Conídio oval (Co) com 4 h de inoculação com tubo germinativo (Tg) em formação (escala: (B) 9 μ m; (C) 10 μ m); (D-E) Conídio oval (Co) com 10 h de inoculação com formação do apressório (Ap) próximo ao conídio (escala 20 μ m) e a partir do tubo germinativo (Tg) (escala 10 μ m); (F) Apressório (Ap) com poro de penetração (P) formado a partir de um conídio (escala 10 μ m).

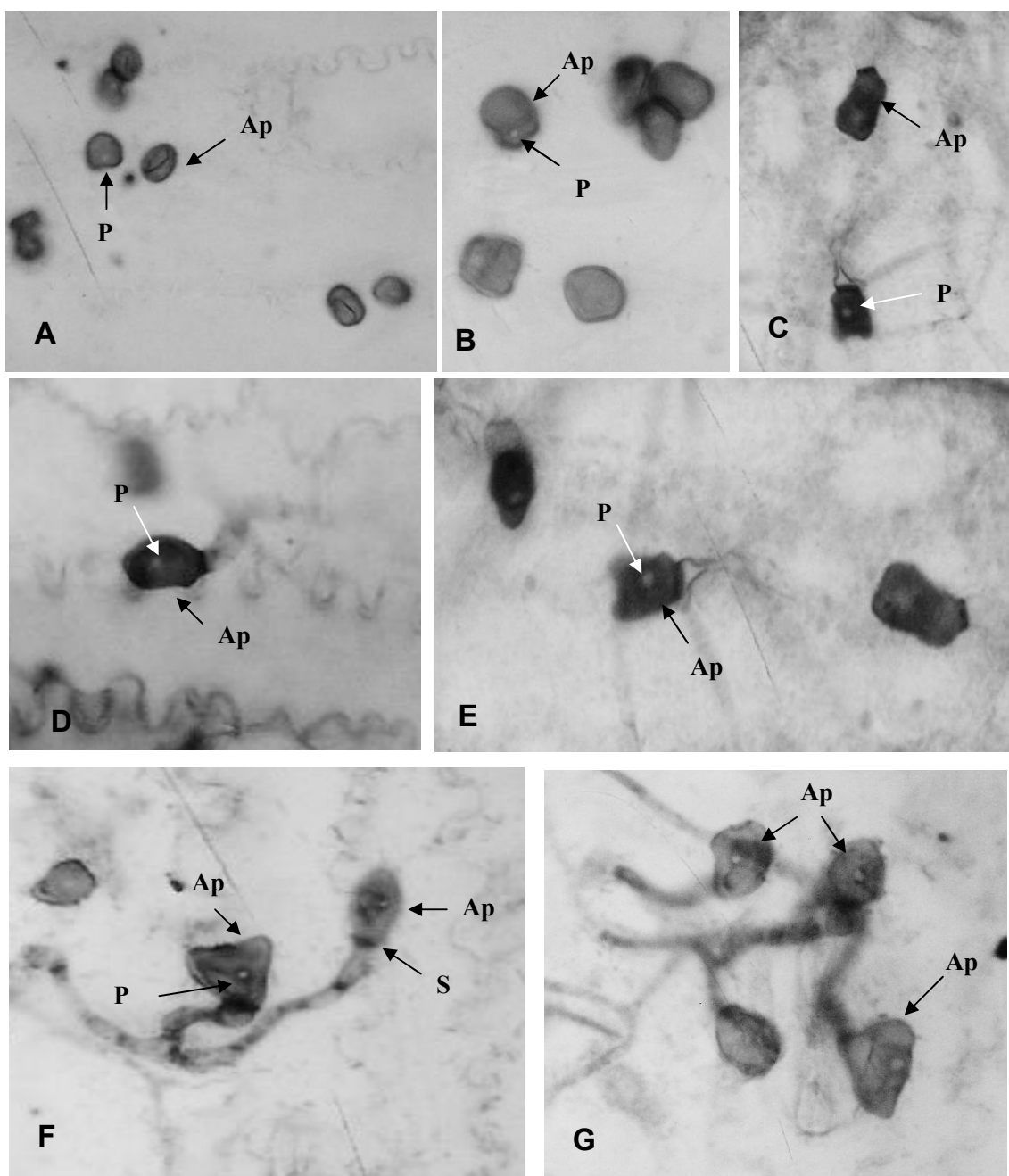


Figura 3. Fotomicrografias de tecido foliar de sorgo tratado com álcool acético e corados com Trypan blue (0,005%), demonstrando a morfologia de apressórios formados a partir de conídios falcados e ovais e a formação do poro de penetração do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineolum* após inoculação (A – G). (A) Apressórios (Ap) redondos com superfície lisa, formados a partir de conídios falcados após 48 h de inoculação (escala 20 μ m); (B) poro de penetração (P) em apressório (Ap) melanizado formados de conídios falcados (escala 9 μ m); (C-E) Apressórios (Ap) ligeiramente irregulares e no centro a presença do poro de penetração(P), formados da germinação de conídios ovais com 10 h de inoculação (escala 10 μ m); (F-G) Após 168 h, apressórios (Ap) irregulares e apressórios lobulados com poro de penetração podem ser visualizados (escala 10 μ m).

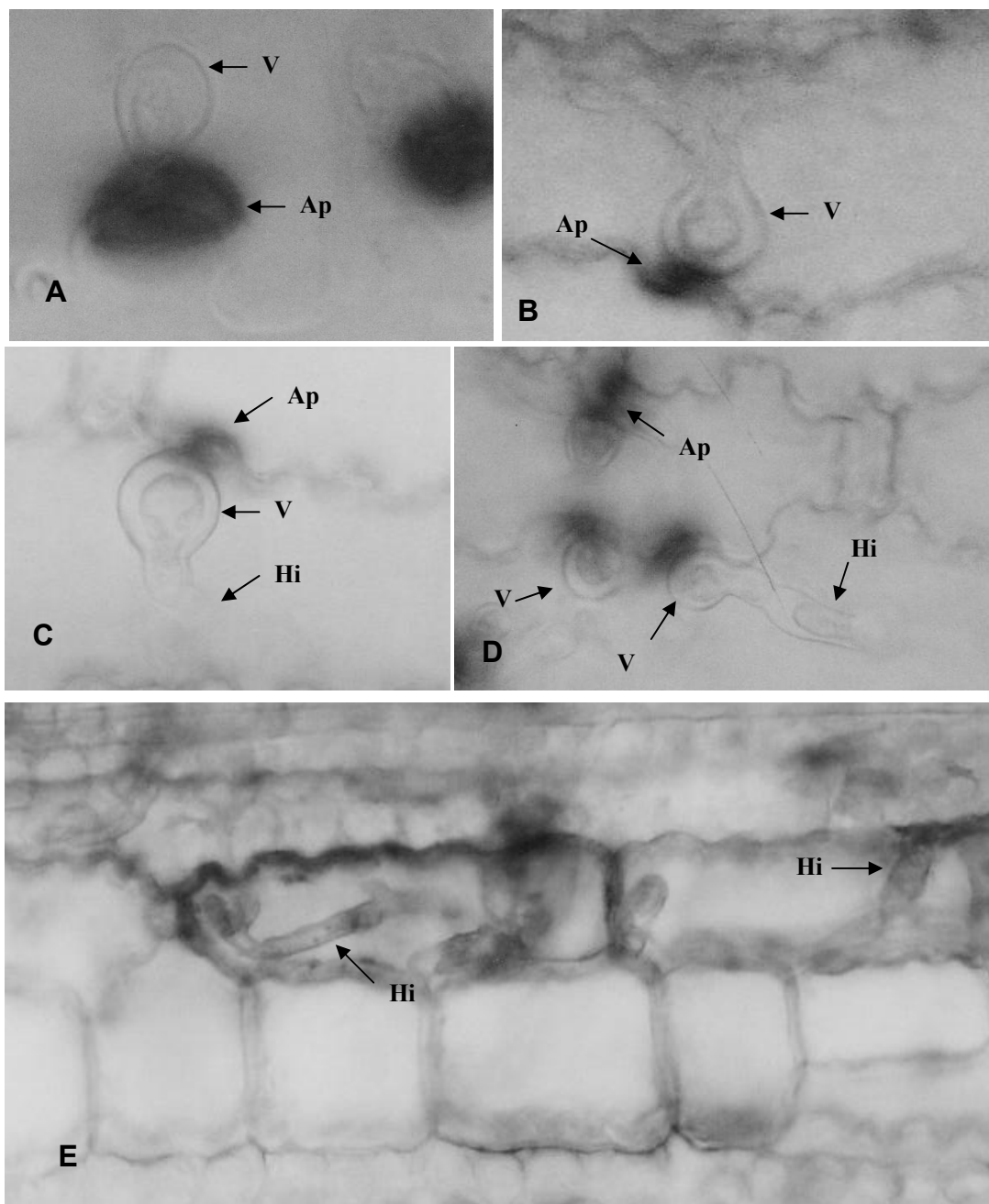


Figura 4. Fotomicrografias de células do tecido foliar de sorgo tratados com álcool acético e corados com Trypan blue (0,005%), demonstrando as hifas e vesículas de infecção (A-E). (A-B) Apressórios (Ap) são visualizados na região mais escura e em seguida a vesícula (V) de infecção que se forma logo abaixo na célula após 48 h de inoculação. Estes apressórios foram formados a partir da germinação de conídios falcados do isolado 204.01 de *C. sublineolum* (escala: (A) 11 μm ; (B) 60 μm); (C-D) Apressórios (Ap), vesículas (V) e hifas de infecção (Hi) formada após 48h de inoculação de conídios ovais do isolado 204.01 de *C. sublineolum* (escala: (C) 9 μm ; (D) 11 μm); (E) Hifa de infecção (Hi) crescendo em diferentes direções após 120 h de inoculação de conídios ovais do isolado 204.01 de *C. sublineolum* (escala 20 μm).

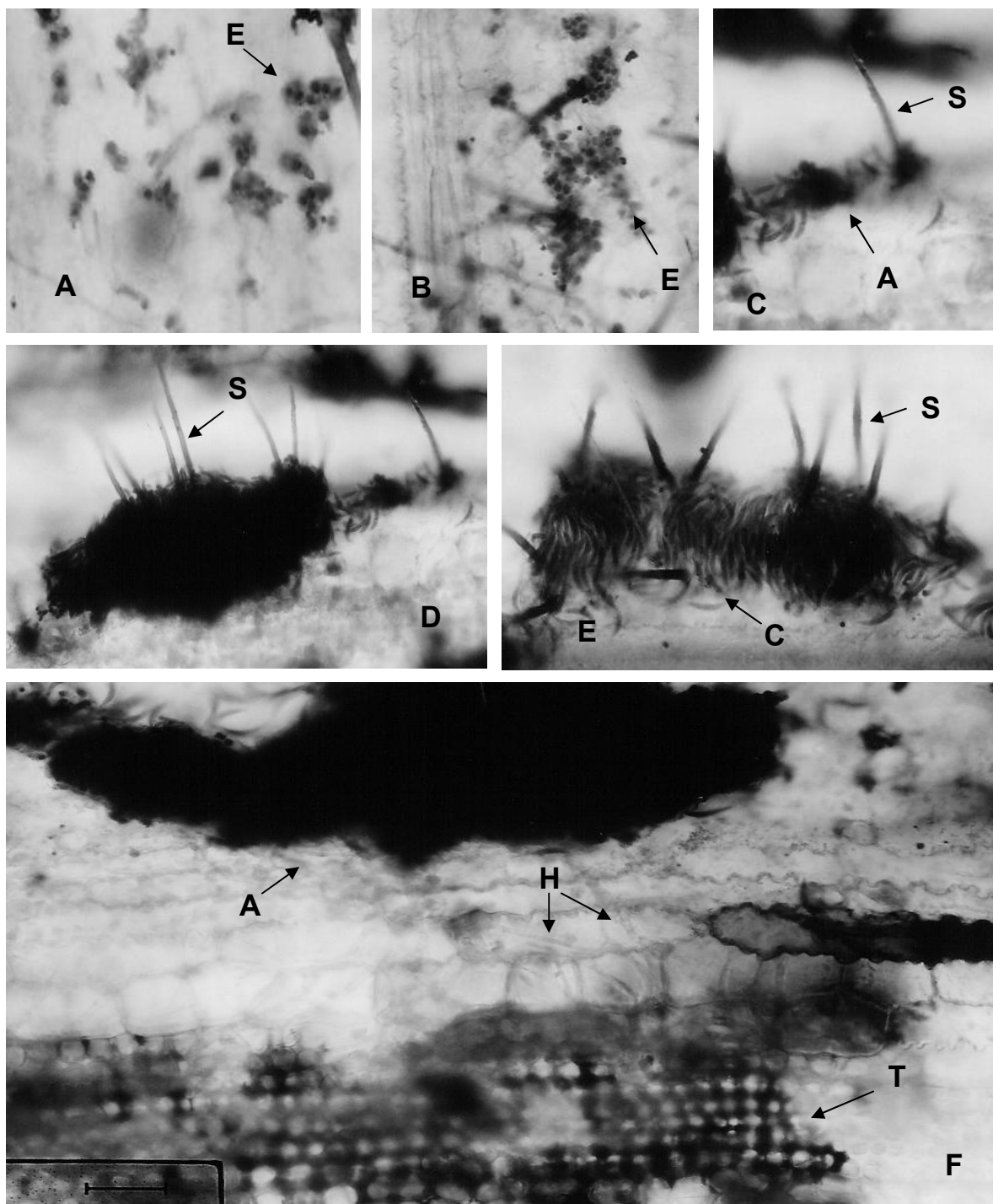


Figura 5. Fotomicrografias de células do tecido foliar de sorgo tratados com álcool acético e corados com Trypan blue (0,005%), demonstrando formação de acérvulos a partir de conídios ovais que germinaram e colonizaram os tecido foliar (A-F). (A-B) Com 96h de inoculação, houve agregação de hifas e a formação do estroma (E) (escala 50 μ m); (C-E) Acérvulos (A) com setas (St) e conídios falcados (Cf) em abundância após 144h de inoculação (escala 50 μ m); (F) Acérvulo (A) produzindo conídio falcado (Cf), hifas infectivas (Hi) nas células do tecido foliar e tecido necrosado (Tn) (escala 40 μ m).

Tabela 1. Frequência de germinação de conídios falcado e oval de isolados de *Colletotrichum sublineolum* sobre folhas destacadas de cinco cultivares de sorgo com 25 dias de idade, em intervalos de tempo definidos após a inoculação. (Média de 4 repetições com 25 conídios cada)

		Germinação de conídios sobre superfície das folhas (%)													
		Isolado 204.01						Isolado 8502							
		2h	4h	6h	8h	10h	24h	48h	2h	4h	6h	8h	10h	24h	48h
Cultivar	BR005	18	70	93 a ⁽¹⁾	86	92	98	100	30	42	64	67	79 b	89	95
	BR008	25	75	83 b	88	90	92	96	21	48	68	78	93 a	97	99
	BR009	21	76	82 b	89	93	98	99	19	49	62	72	82 ab	94	98
	210B	27	62	80 b	87	95	96	99	26	44	59	75	90 ab	97	97
	SC283	18	62	73 b	82	92	94	98	14	36	60	73	93 ab	96	99
		ns ⁽³⁾	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns
Conídio	Falcado	22	78 A ⁽²⁾	82	85	95	98 A	99	14 B	37 B	69 A	76	95 A	99 A	100 A
	Oval	22	60 B	83	88	90	93 B	98	30 A	50 A	56 B	70	80 B	90 B	95 B
		ns		ns	ns	ns		ns			ns				
cv%		25,33	14,37	10,99	17,63	13,56	10,25	5,99	38,18	15,70	14,91	13,38	12,05	8,76	7,13

⁽¹⁾ Médias dos cultivares, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

⁽²⁾ Médias dos conídios falcado e oval, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$.

⁽³⁾ ns: não significativo

Tabela 2. Frequência de formação de apressório a partir de conídio falcado e oval de dois isolados de *Colletotrichum sublineolum* sobre folhas destacadas de cinco cultivares de sorgo com 25 dias de idade, em intervalos de tempo definidos. (Média de 4 repetições com 25 conídios cada)

		Formação de apressório sobre superfície das folhas (%)											
		Isolado 204.01						Isolado 8502					
		4h	6h	8h	10h	24h	48h	4h	6h	8h	10h	24h	48h
Cultivar	BR005	50 ab ⁽¹⁾	52	54	55 b	95	95	9 ab	29 a	55 ab	82 ab	89	96
	BR008	58 a	57	73	77 a	87	99	16 a	39 a	67 a	86 a	91	96
	BR009	57 a	63	74	76 ab	91	100	12 ab	33 a	48 b	82 a	89	98
	210B	37 ab	60	66	79 a	92	97	13 ab	14 b	52 ab	71 b	91	97
	SC283	34 b	58	63	82 a	89	94	8 b	19 ab	55 ab	75 ab	90	97
		ns ⁽³⁾		ns		ns						ns	
Conídio	Falcado	63 A	74 A	80 A	89 A	95 A	98	24 A	42 A	62 A	93 A	99 A	99
	Oval	31 B	42 B	52 B	59 B	86 B	97	0 B	12 B	50 B	65 B	81 B	95
		ns					ns					ns	
cv%		25,89	16,21	18,85	14,73	8,86	8,69	22,13	30,15	16,23	12,14	7,96	8,50

⁽¹⁾ Médias dos cultivares, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

⁽²⁾ Médias dos conídios falcado e oval, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$.

⁽³⁾ ns: não significativo

Tabela 3. Freqüência de conídio falcado e oval de *Colletotrichum sublineolum* que formaram o poro de penetração sobre folhas destacadas de cinco cultivares de sorgo com 25 dias de idade, em intervalos de tempo definidos. (Média de 4 repetições com 25 conídios cada)

Formação do poro de penetração sobre a superfície da folha (%)														
		Isolado 204.01						Isolado 8502						
		4h	6h	8h	10h	24h	48h	4h	6h	8h	10h	24h	48h	
Cultivar	BR005	0	0	0	9	36	79 a	0	0	0	8	12 b	33 b	
	BR008	0	0	0	5	19	38 b	0	0	0	5	18 ab	31 b	
	BR009	0	0	3 a ⁽¹⁾	3	22	45 b	0	0	0	11	24 ab	58 a	
	210B	0	0	4 a	11	19	41 b	0	0	0	9	15 b	36 b	
	SC283	0	0	0	6	10	33 b	0	0	0	13	29 a	43 ab	
					ns ⁽³⁾	ns								
Conídio	Falcado	0	0	3 A ⁽²⁾	12 A	18 B	47	0	0	0	16 A	22	35 B	
	Oval	0	0	0 B	3 B	25 A	48	0	0	0	3 B	18	45 A	
					ns	ns								
cv%				58,64	57,29	30,27	14,61					55,39	25,66	19,93

⁽¹⁾ Médias dos cultivares, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

⁽²⁾ Médias dos conídios falcado e oval, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$.

⁽³⁾ ns: não significativo

Tabela 4. Frequência de conídio falcado e oval de *Colletotrichum sublineolum* que formaram hifas de infecção no interior de células epidérmicas de cinco cultivares de sorgo com 25 dias de idade, em intervalos de tempo definido. (Média de 4 repetições com 25 conídios cada)

		Hifa de infecção observadas em células da epiderme											
		Isolado 204.01						Isolado 8502					
		10h	24h	48h	72h	96h	120h	10h	24h	48h	72h	96h	120h
Cultivar	BR005	0	21 a ⁽¹⁾	45 a	59	64	84 ab	0	0 b	17 b	31 b	63	82
	BR008	0	9 ab	19 b	49	60	67 b	0	2 ab	8 b	37 b	60	73
	BR009	0	9 ab	32 ab	52	71	75 b	0	2 ab	42 a	63 a	73	83
	210B	0	7 ab	24 b	42	70	77 ab	0	2 ab	10 b	41 b	64	78
	SC283	0	4 b	20 b	58	75	93 a	0	5 a	13 b	41 b	72	89
		ns ⁽³⁾			ns			ns			ns		
Conídio	Falcado	0	12 A ⁽²⁾	34 A	64 A	73 A	88 A	0	1	17 B	51 A	73 A	89 A
	Oval	0	8 B	21 B	40 B	63 B	70 B	0	3	19 A	34 B	59 B	73 B
		ns											
cv%			55,37	23,37	19,13	17,76	13,46		132,5	32,63	21,12	16,31	13,43

⁽¹⁾ Médias dos cultivares, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra minúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

⁽²⁾ Médias dos conídios falcado e oval, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). Os dados foram transformados em $\arcsin \sqrt{p/100}$.

⁽³⁾ ns: não significativo

Tabela 5. Número de acérvulo por segmento foliar após inoculação de conídios falcado e oval de *Colletotrichum sublineolum* sobre folhas destacadas de 25 dias idade de cinco cultivares de sorgo, em intervalos de tempo definidos após a inoculação. (Média de 4 repetições com 25 conídios cada)

		Número de acérvulo													
		Isolado 204.01							Isolado 8502						
		48h	72h	96h	120h	144h	168h	2 s*	48h	72h	96h	120h	144h	168h	2 s*
Cultivar	BR005	0	7 c ⁽¹⁾	9 b	54 b	74 b	122 c	258 c	0	9 a	10 b	56 ab	81 bc	142 b	292 b
	BR008	0	0 d	26 ab	46 b	123 b	199 bc	301 c	0	0 b	27 ab	46 b	110 bc	188 a	267 b
	BR009	0	12 b	27 a	93 a	209 a	294 a	498 a	0	12 a	25 ab	90 a	184 a	238 a	443 a
	210B	0	18 a	30 a	47 b	65 b	132 c	324 b	0	10 a	27 ab	51 ab	68 c	132 b	298 b
	SC283	0	9 bc	28 a	74 ab	154 a	194 b	374 b	0	8 a	29 a	77 ab	93 b	183 b	485 a
Conídio	Falcado	0	18 A ⁽²⁾	48 A	125 A	206 A	307 A	510 A	0	16 A	47 A	128 A	188 A	284 A	497 A
	Oval	0	0 B	0 B	0 B	44 B	69 B	192 B	0	0 B	0 B	0 B	27 B	68 B	217 B
cv%			13,74	27,31	17,88	17,30	14,86	9,45		18,97	28,34	14,91	11,20	14,05	9,27

⁽¹⁾ Médias dos cultivares, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra minúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05)

⁽²⁾ Médias dos conídios falcado e oval, para um mesmo isolado e no mesmo tempo, seguidas de mesma letra maiúscula, na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05). Os dados foram transformados em $\text{arc sen } \sqrt{p/100}$.

(2 s*) duas semanas

5. 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L. Ciclos primários e secundários. In: BERGAMIN, F, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Eds.). **Manual de Fitopatologia – princípios e conceitos**. São Paulo, Ceres, 1995. p. 234-245.

BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: Bailey, J.A. & Jeger, M.J. (Eds.) ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control***. C.A.B. International, Wallingford, 1992. p.88-120.

BERGSTROM, G. C.; NICHOLSON, R. L. The biology of *Colletotrichum graminicola* and maize anthracnose. In: Prusky, D.; Freeman, S.; Dickman, M. B.(Eds.) ***Colletotrichum: Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction***. APS Press-The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, 2000. p. 374-393.

BUSCH, L. V.; WALKER J. C. Studies of cucumber anthracnose. *Phytopathology*. v. 48, p. 302-304, 1958.

BROWNING, M.; ROWLEY, L. V.; ZENG, P.; CHANDLEE, J. M.; JACK-SON, N. Morphological, pathogenic and genetic comparisons of *Colletotrichum graminicola* isolates from Poaceae. **Plant Disease**, v. 83, p. 286-292, 1999.

FREDERIKSEN, R. A.; THOMAS, M. D.; BANDYOPADHYAY, R.; MUGHOGHO, L. Variable pathogens of sorghum. In: Leslie, J. F.; Frederiksen, R. A., (Eds.) **Disease Analysis through Genetics and Biotechnology**. Interdisciplinary Bridges to Improved Sorghum and Millet Crops. Iowa State University Press. Ames, 1995, p. 11-23.

HOLLIDAY, P. **Fungus disease of tropical crops**. Cambridge University Press, Cambridge. 1980. 624 p.

KHAN, A.; HSIANG, T. The infection process of *Colletotrichum graminicola* and relative aggressiveness on four turfgrass species. **Canadian Journal of Microbiology**. v. 49, p. 433-442, 2003.

KUBO, Y.; FURUSAWA, I. Localization of melanin in appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 280-282, 1986.

LEITE, B.; RONCATO, L. D. B.; PASCHOLATI, S. F.; LAMBRAIS, M. R.. Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v. 5, p. 235-280, 1997.

LEITE, B.; PASCHOLATI, S. F.; KITAJIMA, E. W.; ISHIDA, M. L. Mecanismos de adesão de bactérias e fungos às plantas hospedeiras. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**. v. 9, p119-157, 2001.

LOPEZ, A. M. Q. Taxonomia, patogênese e controle de espécies do gênero *Colletotrichum*.

Revisão Anual de Patologia de Plantas. v. 9, p. 291-338, 2001.

MERCURE, E. W.; LEITE, B.; NICHOLSON, R. L. Adhesion of ungerminated conidia of *Colletotrichum graminicola* to artificial hydrophobic surfaces. **Physiological and Molecular**

Plant Pathology. v. 45, p. 421-440, 1994.

NICHOLSON, R. L.; EPSTEIN, L. Adhesion of fungi to the plant surface: prerequisite for pathogenesis. In: Cole, G. T.; Hoch, H. C. (Eds). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York. Plenum Press, 1991, p. 3-23.

PAIN, N.A.; GREEN, J. R.; JONES, G. L.; O'CONNELL, R. J. Composition and organization of extracellular matrices around germ-tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*.

Protoplasma, v. 190, p. 119-130, 1996.

PANACCIONE, D. G.; VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. **Mycologia**. v. 81, p. 875-882, 1989.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H.; BLEDDYN, H.; O'CONNELL, R. J.; GREEN, J. R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal**

Genetics and Biology, v. 27, p. 186-198, 1999.

SELA-BUURLAGE, M. B.; EPSTEIN, L.; ODRIGUEZ, R. J. Adhesion of ungerminated *Colletotrichum musae* conidia. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, v. 39, p. 345-352, 1991.

SHERRIF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; BAILEY, J.A. rDNA sequence analysis confirms the distinction between *Colletotrichum graminicola* and *C. sublineolum*. **Mycological Research**, v. 99, p. 475-478, 1995.

SOUZA-PACCOLA, E. A.; FAVARO, L. C. L.; BOMFETI, C. A.; MESQUITA, S. F. P.; PACCOLA-MEIRELLES, L. D. Cultural characterization and conidial dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*. **Journal Phytopathology**. v. 151, p. 383-388, 2003.

SUTTON, B. C. The apressorium of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. **Canadian Journal Botany**. v. 46, p. 873-876, 1968.

SUTTON, B.C. **The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Pycnidia, Acervuli and Stromata**. Commonwealth Mycological Institute, Kew, London, 1980. 696p.

THROWER, L. B. Terminology for plant parasites. **Phytopathologische Zeitschrift**, v. 56, p. 258-259, 1966.

VAILLANCOURT, L. J.; HANAU, R. M. Genetic and morphological comparisons of *Glomerella (Colletotrichum)* isolates from maize and from sorghum. **Experimental Mycology**, v. 16, p. 219-229, 1992.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M. A cytological study of compatible and incompatible interactions between *Sorghum bicolor* and *Colletotrichum sublineolum*. **New Phytologist**, v.134, p. 25-34, 1996.

WHARTON, P. S.; JULIAN, A. M.; O'CONNELL R. J. Ultrastructure of the infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. **Phytopathology**, v. 91, p.149-158, 2001.

6. CONCLUSÃO

Com estes trabalhos foi possível concluir que:

Os processos de pré-penetração, penetração e infecção de conídios ovais de *C. sublineolum* foram similares aos dos conídios falcados. Conídios ovais mostraram-se infectivos e capazes de completar o ciclo da doença, além disso, são produzidos internamente nas células epidérmicas, nas extremidades das hifas de infecção.

Se conídios ovais possuem um papel efetivo na doença, provavelmente este possa ser o de propagação dentro da planta para promover a proliferação do fungo, ao contrário da dispersão, uma função associada aos conídios falcados os quais são produzidos externamente na superfície da lesão. Esta sugestão tem papel especulativo e deve ser confirmada através de experimentos adicionais. Acreditamos na importância dos conídios ovais no desenvolvimento da doença e estes devem ser incluídos como uma característica desta espécie.