



**QUÉLEN DE LIMA BARCELOS**

**ANÁLISE DOS EVENTOS DE PRÉ E PÓS  
PENETRAÇÃO DE ISOLADOS DE *Colletotrichum*  
*lindemuthianum* NO FEIJOEIRO**

**LAVRAS – MG  
2010**

**QUÉLEN DE LIMA BARCELOS**

**ANÁLISE DOS EVENTOS DE PRÉ E PÓS PENETRAÇÃO DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* NO FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Biotecnologia, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora  
Dra. Elaine Aparecida de Souza

**LAVRAS – MG  
2010**

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca da UFLA**

Barcelos, Quélen de Lima.

Análise dos eventos de pré e pós penetração de isolados de  
*Colletotrichum lindemuthianum* no feijoeiro / Quélen de Lima  
Barcelos. – Lavras : UFLA, 2010.

62 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Elaine Aparecida de Souza.

Bibliografia.

1. *Glomerella*. 2. Antracnose. 3. Fase sexual. 4. Interação  
patógeno x hospedeiro. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 632.43

**QUÉLEN DE LIMA BARCELOS**

**ANÁLISE DOS EVENTOS DE PRÉ E PÓS PENETRAÇÃO DE  
ISOLADOS DE *Colletotrichum lindemuthianum* NO FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, área de concentração em Biotecnologia, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de outubro de 2010.

Dr. João Bosco dos Santos	UFLA
Dr. Ludwig Heinrich Pfenning	UFLA
Dra. Maria Cristina Mendes Costa	UNILAVRAS
Dra. Marisa Vieira de Queiroz	UFV

Dra. Elaine Aparecida de Souza  
Orientadora

**LAVRAS – MG**

**2010**

*A Deus, por me abençoar com tanta saúde e motivação para viver.  
Aos meus pais, Paula Marta e Carlos Adão, pelo apoio incondicional nos  
momentos bons e difíceis.  
Às minhas irmãs, Carla e Clarissa, por todo carinho e compreensão em todos os  
minutos em que precisei ficar ausente.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que está sempre presente, me guiando, dando força, saúde, motivação e colocando pessoas boas no meu caminho.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade de realização do Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos no Brasil.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Capes, pela concessão da bolsa de estudos no exterior (doutorado sanduíche).

À *University of Kentucky* (Estados Unidos) e ao *Department of Plant Pathology*, por ter me recebido como estudante visitante e permitido o aperfeiçoamento deste trabalho.

À professora e orientadora Elaine Aparecida de Souza, pelos ensinamentos transmitidos, incentivo, apoio e orientação.

À Dra. Lisa Vaillancourt, por ter me recebido em seu grupo de pesquisa na *University of Kentucky* e pela orientação e contribuições a este trabalho.

Aos membros da banca examinadora, professores Maria Cristina Mendes Costa, Marisa Vieira de Queiroz, João Bosco dos Santos e Ludwig Heinrich Pfenning, pelas contribuições para o aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pelos ensinamentos transmitidos durante o Doutorado.

Ao professor Eduardo Alves e ao grupo do Laboratório de Microscopia Eletrônica, por permitirem a realização de parte dos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, Joyce Mariana e Rafael, pela ajuda e agradável convivência diária durante o Doutorado.

Aos colegas do Laboratório de Genética Molecular, em especial ao laboratorista Lamartine, pela disponibilidade e valioso auxílio durante a condução dos trabalhos.

Aos amigos do laboratório da Dra. Lisa Vaillancourt, Ester, Maria, Sladana, Stefan e a técnica Etta, por toda ajuda, paciência e agradável convivência durante o tempo em que estive na *University of Kentucky*.

Aos amigos Ester, Lucas, Daniela, Rogério, Gustavo, Ricardo, Sladana e Santosh, por todo apoio, amizade e todos os momentos bons em Lexington.

Às funcionárias do DBI, Zélia, Rafaela e Irondina, pela convivência e auxílio durante o curso.

À grande amiga Francine, pelas sugestões, parceria em trabalhos e companheirismo em todas as horas.

Ao amigo Fred, pelo incentivo durante o doutorado, companheirismo e ajuda em todos os momentos.

A todos os colegas do GEN que, direta ou indiretamente, auxiliaram na realização deste trabalho, pela ajuda nos estudos e pela excelente convivência.

A toda a minha família, pelo carinho e por sempre me apoiarem, me dando forças para que eu não desistisse e alcançasse os meus objetivos.

A todos os meus queridos amigos, pessoas com quem tive o prazer de encontrar e conviver por essa jornada longa de estudos, pessoas nas quais pude confiar e ter momentos bons enquanto estive longe da família, o meu muito obrigado!

## RESUMO

*Colletotrichum lindemuthianum* (anamórfico) é o agente causador da doença antracnose do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*), resultando em perdas econômicas no Brasil e no mundo. A fase teleomórfica é de rara ocorrência na natureza. Todavia, colônias anamórficas e teleomórficas têm sido isoladas de lesões de antracnose em plantas de feijoeiro coletadas do campo, no Brasil. Portanto, este estudo teve o objetivo de avaliar o comportamento de isolados teleomórficos nos eventos de pré e pós-penetração durante a infecção em plântulas de feijoeiro. Para isto, foram utilizados oito isolados teleomórficos e cinco anamórficos. Os isolados foram inoculados nas cultivares de feijoeiro Pérola, Michelite (suscetíveis) e G2333 (resistente) e o comportamento destes durante a infecção foi observado por meio da microscopia de luz, de fluorescência e eletrônica de varredura. Foram realizadas análises *in vitro* e *in vivo* da porcentagem de germinação de ascósporos e conídios e formação de apressórios. Foram obtidas linhagens transformantes expressando a proteína verde fluorescente que foram utilizadas em inoculações nas cultivares Pérola (suscetível) e G2333 (resistente) na avaliação dos eventos de pós-penetração. Testes de patogenicidade foram realizados a partir de inoculações em hipocótilos das cultivares suscetíveis. Os resultados obtidos mostraram que plantas inoculadas com ascósporos ou conídios dos isolados teleomórficos desenvolvem sintomas brandos ou sem sintomas. Os isolados teleomórficos apresentaram comportamento semelhante ao dos isolados anamórficos na pré-penetração no feijoeiro, porém, com diferenças temporais no desenvolvimento das estruturas. Nos eventos de pós-penetração, os isolados teleomórficos não formaram vesículas de infecção e hifas primárias, exceto na presença de morte celular.

Palavras-chave: *Glomerella*. Antracnose. Fase sexual. Interação patógeno x hospedeiro.

## ABSTRACT

*Colletotrichum lindemuthianum* (anamorphic) causes anthracnose disease on common bean (*Phaseolus vulgaris*), resulting in severe economic losses in Brazil and worldwide. The teleomorphic phase is not common to be found in nature. Anamorphic and teleomorphic strains have been isolated from anthracnose lesions on common bean plants in the field in Brazil. The aim of this study was to evaluate the behaviour of teleomorphic strains at the pre and post-penetration events during infection on common bean plants. Eight teleomorphic and five anamorphic strains were evaluated. The strains were inoculated on common bean cultivars Michelite (susceptible) and G2333 (resistant) and the samples were observed using light microscopy, fluorescence, and scanning electron microscopy. *In vitro* and *in vivo* analyses were made in order to estimate the percentage of germinated ascospores or conidia and aplanospore formation. Transformed strains expressing the green fluorescent protein gene were obtained and inoculated on cultivars Pérola (susceptible) and G2333 (resistant). Post-penetration events of infection were evaluated. Pathogenicity tests made with hypocotyls of susceptible cultivars showed that plants inoculated with ascospores or conidia from teleomorphic strains developed mild symptoms or no symptoms. Teleomorphic and anamorphic strains behaved similarly during the pre-penetration events of infection in common bean plants. However they showed temporal differences during the development of structures. During the post-penetration events of infection the teleomorphic strains did not form infection vesicles and primary hyphae, except when tissues had been killed with dry ice.

Keywords: *Glomerella*. Anthracnose. Sexual phase. Host x pathogen interaction.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	12
2.1	<i>Glomerella cingulata</i> (Stonem) Spauld & Schrenck f. sp. <i>phaseoli</i> ..	12
2.2	<i>Colletotrichum lindemuthianum</i> e a sintomatologia da antracnose do feijoeiro.....	14
2.3	Infecção e colonização em <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> .....	16
2.4	Metodologias para estudo da infecção.....	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1	Origem e manutenção dos isolados .....	21
3.2	Análise da germinação e eventos de pré-penetração de conídios e ascósporos.....	23
3.2.1	Análise da germinação <i>in vitro</i> .....	23
3.2.2	Análise da germinação <i>in vivo</i> .....	23
3.2.3	Análise dos eventos precedentes à penetração e MEV.....	24
3.3	Análise dos eventos pós-penetração.....	25
3.3.1	Transformação de isolados .....	26
3.3.2	Inoculações com isolados selvagens e obtenção de amostras .....	26
3.3.3	Inoculações com isolados transformantes.....	27
3.3.4	Coinoculações com isolados anamórficos e teleomórficos.....	28
3.4	Testes de patogenicidade.....	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1	Ascósporos germinam mais rápido do que conídios.....	31
4.2	Ascósporos e conídios germinam e formam apressórios na superfície de folhas.....	32
4.3 I	Isolados teleomórficos causam sintomas brandos no feijoeiro <i>in vivo</i> e não causaram sintomas em hipocótilos <i>in vitro</i> .....	39
4.4	Isolado teleomórfico exibe comportamento epifítico e oportunista no feijoeiro.....	44
4	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara é o agente causal da antracnose no feijoeiro, uma das doenças de maior importância dessa cultura. Perdas ocasionadas por este patógeno podem ser totais, quando são utilizadas sementes infectadas e as condições ambientais são favoráveis.

A resistência genética é a medida mais eficaz de controle desse patógeno, no entanto, a obtenção de cultivares resistentes é dificultada pela ocorrência de ampla variabilidade. Além disso, a durabilidade da resistência é afetada pelo potencial evolutivo da população do patógeno. O modo de reprodução é um dos fatores mais importantes no estudo do potencial evolutivo, patógenos que possuem sistema de reprodução misto ou sexual têm maiores chances de vencer os alelos de resistência do hospedeiro (MCDONALD; LINDE, 2002).

A fase teleomórfica (sexual) de *C. lindemuthianum* foi observada por Shear e Wood (1913) e denominada *Glomerella lindemuthianum*. Na natureza, as suas estruturas de reprodução não foram observadas. No entanto, tem se observado que a organização e a diversidade genética das populações deste patógeno são mais semelhantes à de populações originadas de reprodução sexuada (BRYGOO et al., 1998; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR, 2010).

Nos últimos vinte anos, em estudos genéticos utilizando marcadores morfológicos e moleculares tem sido demonstrada a formação de recombinantes durante a fase teleomórfica (BATISTA; CHAVES, 1982; BRYSON, 1990; CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; LUNA-MARTINEZ et al., 2007; MENDES-COSTA, 1996; RODRIGUEZ-GUERRA et al., 2005; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR, 2010).

O isolamento de culturas teleomórficas a partir de lesões de antracnose no feijoeiro não é comum. No entanto, tem sido frequente em algumas regiões produtoras de feijão no Brasil (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; SILVA; SOUZA; ISHIKAWA, 2007; SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). Em testes de patogenicidade, foi observado que plântulas inoculadas com os isolados teleomórficos apresentam sintomas brandos da doença, em comparação com a inoculação a partir de isolados anamórficos de *C. lindemuthianum* (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007). No entanto, não existem relatos que detalhem o comportamento desses isolados teleomórficos no feijoeiro.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento dos isolados teleomórficos nos eventos de pré e pós-penetração durante a infecção em plântulas de feijoeiro, com e sem a presença de isolados anamórficos de *C. lindemuthianum*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 *Glomerella lindemuthianum* (Shear)

A classificação dos Ascomicetos baseia-se em sua forma de reprodução sexual (forma meiospórica = forma sexual = forma teleomórfica). Portanto, *C. lindemuthianum* teve denominação teleomórfica inicialmente como *Glomerella lindemuthianum* (SHEAR; WOOD, 1913). Poucos trabalhos foram realizados desde então, e Kimati e Galli (1970) propuseram o nome *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenck f.sp. *phaseoli*.

Nesta fase, o fungo produz peritécio (corpo de frutificação) mais ou menos arredondado, com diâmetro que varia de 85 a 300  $\mu\text{m}$ . Os rostros, quando presentes, medem de 30 a 80  $\mu\text{m}$ . O canal do peritécio é forrado por paráfises (filamentos estéreis dos corpos de frutificação) hialinas e filiformes. A parede do peritécio é inicialmente hialina e, à medida que envelhece, torna-se enegrecida a partir do ápice. Dentro dos peritécios estão os ascos em forma de bastão ou cilíndricos, com parede fina e cada um contendo de um a oito ascósporos aleatoriamente arranjados. Os ascósporos não apresentam septo, são hialinos, fusiformes ou curvados. Em número médio de trinta ascos por peritécio, os ascos medem 60 x 8  $\mu\text{m}$ , podendo o comprimento variar entre 48 a 68  $\mu\text{m}$  e envolvidos por paráfises filiformes e delicadas, que desaparecem a partir do 27º dia. Os ascósporos são de dois tipos: alantoides (20 x 6,5  $\mu\text{m}$ ) e elipsoidais (10 x 4  $\mu\text{m}$ ). Cada asco contém de um a oito ascósporos alantoides ou oito ascósporos elipsoidais (KIMATI; GALLI, 1970). Em plantas infectadas eles estão incrustados nos tecidos, comumente em folhas ou vagens mortas (HOLLIDAY, 1980 citado por BAILEY; JEGER, 1992).

O sistema de acasalamentos em Ascomicetos é dividido, basicamente, em dois tipos principais: homotalismo, em que os isolados são autoférteis e o

heterotalismo, em que os isolados são autoestéreis (BAILEY; JEGER, 1992). Isolados heterotáticos têm a habilidade de se acasalar somente se os parentais tiverem genes “mating-types” diferentes (genes que regulam os tipos de acasalamento).

Em algumas espécies heterotáticas, o acasalamento é controlado por um único loco, podendo ser determinada por dois alelos alternativos ou por uma série alélica. Em outras espécies, o acasalamento é controlado por dois locos, em que um loco pode ter dois alelos alternativos e o segundo loco, com múltiplos alelos, ou ambos os locos podem ter múltiplos alelos (COPPIN; DEBUCHY; PICARD, 1997; KRONSTAD; STABEN, 1997; MEINHARDT; ESSER, 1990). De maneira geral, o acasalamento em ascomicetos heterotáticos é controlado por um único loco “mating-type” com dois alelos alternativos de sequências de DNA não relacionadas, conhecidas como idiomorfos (GLASS; KULDAU, 1992; METZENBERG; GLAS, 1990).

O gênero *Glomerella* não se encaixa simplesmente nessas categorias, apresentando espécies sexualmente ambíguas (BAILEY; JEGER, 1992). Dentro de uma única espécie alguns isolados são homotáticos, enquanto outros apresentam comportamento heterotático (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000).

Experimentos das décadas de 1940 e 50 permitiram a descrição da morfologia da iniciação do peritécio, a plasmogamia, a meiose, o desenvolvimento dos ascos e ascósporos e a regulação genética dos acasalamentos de *G. cingulata* (CHILTON; LUCAS; EDGERTON, 1945; CHILTON; WHEELER, 1949a, 1949b; DRIVER; WHEELER, 1955; EDGERTON; CHILTON; LUCAS, 1945; LUCAS, 1946; LUCAS; CHILTON; EDGERTON, 1944; MCGAHEN; WHEELER, 1951; WHEELER, 1950, 1956; WHELLER; DRIVER; CAMPA, 1959; WHEELER et al., 1948).

Em algumas publicações mais recentes relatam-se o isolamento e a utilização da fase teleomórfica de *C. lindemuthianum*. Em cruzamentos, em alguns estudos foram observados isolados comportando-se como homotáticos (CAMARGO JÚNIOR et al., 2007; MENDES-COSTA, 1996; SOUZA; CAMARGO JÚNIOR, 2010) e, em outros, como heterotáticos (BATISTA; CHAVES, 1982; BRYSON, 1990; KIMATI; GALLI, 1970; RODRIGUES-GUERRA et al., 2005).

Brygoo et al. (1998) e Souza e Camargo Júnior (2010), estudando a reprodução e a estrutura populacional de fungos fitopatogênicos, verificaram que, no caso do *C. lindemuthianum*, apesar de ser encontrado na forma assexual e de suas estruturas de reprodução sexuais não terem sido observadas na natureza, sua organização e diversidade genética são mais semelhantes à de populações originadas de reprodução sexuada do que populações assexuadas. Este é um indicativo de que, realmente, ela pode estar ocorrendo no campo e explicaria a grande variabilidade genética verificada em vários estudos (DAMASCENO et al., 2007; ISHIKAWA et al., 2008; ISHIKAWA; SOUZA; DAVIDE, 2008; MAHUKU; RIASCOS, 2004).

## **2.2 *Colletotrichum lindemuthianum* e a sintomatologia da antracnose do feijoeiro**

O estado anamórfico do fitopatógeno causador da antracnose no feijoeiro (SUTTON, 1992) foi descoberto primeiramente (forma mitospórica = forma assexual = forma anamórfica) e o seu nome amplamente empregado e conhecido como *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.).

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* se reproduz, portanto, de forma assexual, produzindo os conídios num corpo de frutificação denominado acérvulo. Apresenta micélio septado e ramificado, com coloração variando de

hialina a quase negra (WALKER, 1959). Os conídios formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura, sendo unicelulares, hialinos e retos ou cilíndricos, medindo de 9,5-11,5 x 3,5-4.5  $\mu\text{m}$ . Por ocasião da germinação, um conídio pode emitir um ou mais tubos germinativos, que podem formar apressórios em seus ápices ou continuar crescendo, formando as hifas e os micélios. Os apressórios são marrom-escuros e ovais, medindo 8 x 6-7  $\mu\text{m}$ , não formando complexos (SUTTON, 1992).

O aparecimento de sintomas pode ser observado a partir do sexto dia após o início da infecção afetando plantas de feijão em todos os estágios de desenvolvimento, atacando folhas, caules, ramos, vagens e sementes (ARAÚJO, 1988; KIMATI et al., 1997).

A doença surge na lavoura pela presença do patógeno nos restos culturais ou pela utilização de sementes infectadas (MACHADO, 1994). Após a germinação das sementes infectadas, podem-se observar lesões escuras nos cotilédones e no hipocótilo das plântulas. As lesões ocorrem com maior frequência nos pecíolos, na superfície inferior das folhas e nas nervuras. Tais regiões apresentam manchas de coloração marrom-escura ou parda que atingem inicialmente as nervuras principais até as nervuras secundárias à medida que a doença progride. No pecíolo e no caule, as manchas são geralmente ovaladas, deprimidas e de coloração escura, podendo causar queda das folhas e tombamento da plântula. Nas vagens, as manchas são arredondadas, deprimidas e pardo-escuras, com bordas salientes pardo-avermelhadas. Quando as condições ambientais são favoráveis, uma massa de coloração rósea pode ser observada no centro das lesões, formada por conídios (PRIA et al., 1999; VIEIRA, 1983). Os esporos são, então, levados a outras plantas, principalmente pela ação de gotículas de chuva ou irrigação na lavoura.

### 2.3 Infecção e colonização em *Colletotrichum lindemuthianum*

*Colletotrichum lindemuthianum* é um fungo hemibiotrófico, ou seja, se comporta como biotrófico no início da fase de infecção, passando a necrotrófico nas fases finais da colonização do tecido hospedeiro (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Os fungos biotróficos se caracterizam pela capacidade de absorção de nutrientes do seu hospedeiro, sem que suas células sejam mortas. O controle da interação patógeno-hospedeiro é realizado por trocas de sinais químicos entre esses, que resultarão na ativação ou na repressão de determinados genes. A manutenção dessa relação necessita de um fino controle genético de ambos, principalmente do patógeno que suprime as respostas de defesa, ao mesmo tempo em que mantém a célula vegetal viável para suprir suas necessidades nutricionais.

Os estudos de desenvolvimento, adesão de estruturas de infecção, biotrofia e necrotrofia foram realizados utilizando-se *C. lindemuthianum* como sistema modelo (O'CONNELL et al., 2000). Nestas pesquisas empregaram-se microscopia eletrônica de transmissão e anticorpos monoclonais presentes em estruturas isoladas do tecido do hospedeiro para a identificação de componentes fúngicos expressos em diferentes estágios da infecção (O'CONNELL et al., 1996; PAIN et al., 1994).

O processo de infecção e as estruturas formadas por fungos fitopatogênicos biotróficos e hemibiotróficos podem ser caracterizados da seguinte maneira (PERFECT; GREEN, 2001).

O conídio germina e emite o tubo germinativo cerca de 18 horas após a sua deposição sobre a folha do hospedeiro. Em seguida, um apressório melanizado é formado na extremidade do tubo germinativo (BAILEY; JEGER, 1992). A partir dessa estrutura, diferencia-se a hifa peg de penetração que atravessa a parede celular da primeira célula vegetal. Enzimas hidrolíticas

devem estar envolvidas nesse processo, já que ocorrem modificações químicas nas regiões das paredes celulares próximas ao peg. Deve existir um forte controle na secreção de tais enzimas, pois a atuação das mesmas é localizada.

Uma estrutura grande e esférica, denominada vesícula de infecção, é diferenciada entre a parede celular e a membrana plasmática da célula epidermal. A formação dessa vesícula não ocasiona a morte da célula infectada. A sua função ainda não foi elucidada, mas pode estar envolvida com a manutenção da viabilidade da célula vegetal infectada e/ou com a supressão das respostas de defesa do hospedeiro compatível.

A partir da vesícula de infecção, diferencia-se a hifa primária também com diâmetro grande e aspecto esférico. Essa estrutura tem seu crescimento entre a parede celular e a membrana plasmática das células epidermais e corticais, que permanecem vivas, apesar de sofrerem modificações estruturais no citoplasma. Durante essa fase biotrófica, a membrana plasmática do hospedeiro expande e invagina ao redor das vesículas de infecção e hifas primárias que estão se desenvolvendo e a camada da matriz de interface é depositada entre a parede celular do fungo e a membrana plasmática do hospedeiro. Todavia, cerca de 24 horas depois da penetração, a membrana do hospedeiro perde sua integridade funcional e as células começam a degenerar e morrem (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). Esta matriz extracelular amorfa é parcialmente composta de polissacarídeos e glicoproteínas (O'CONNELL, 1987) e não foi observada no crescimento das hifas secundárias típicas da fase necrotrófica dessa espécie (O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985).

Prosseguindo, cerca de 48 horas após a infecção, observam-se rupturas no tonoplasto e no plasmalema, culminando na completa desorganização do citoplasma dentro de 60 horas, restando apenas fragmentos de membrana. Esse padrão de colonização das células do hospedeiro, no qual a célula vegetal é inicialmente mantida viva (fase biotrófica), seguida de degeneração celular,

repete-se à medida que as hifas primárias vão invadindo as demais células vegetais.

A degeneração ocorrida no intervalo de 60 a 72 horas pode ser observada apenas em microscópio. Os sintomas macroscópicos aparecem depois de decorridas 96-120 horas do início da infecção. Nesse estágio, a hifa primária alcança uma extensão máxima de dez células epidermais e quatro camadas celulares do córtex. O micélio primário ramifica-se numa hifa secundária após 120 horas. Além de possuir diâmetro menor, a hifa secundária é capaz de crescer intercelularmente (pela parede celular ou pela lamela média) e, até mesmo, invadir o lúmen de células vegetais mortas. Essa é a fase necrotrófica típica, na qual as células infectadas e aquelas situadas a uma distância de até 250  $\mu\text{m}$ , que ainda não foram invadidas, possuem o citoplasma modificado e são mortas. O córtex do tecido vegetal está completamente colonizado pela hifa secundária após 6 a 8 dias. Os sintomas macroscópicos da antracnose tornam-se evidentes e característicos. Acérvulos rompendo a camada da epiderme vegetal são evidentes em aproximadamente 10 dias. Tais estruturas têm uma massa de conídios com setas estéreis e melanizadas.

Durante a passagem do modo de biotrófico para o necrotrófico, ocorrem modificações no padrão de crescimento do fungo e nos genes expressos pelo patógeno. A fase necrotrófica é marcada pela degradação maciça do tecido vegetal provocada principalmente pelo aumento na secreção de enzimas hidrolíticas capazes de degradar a parede celular das células vegetais. Em *C. lindemuthianum*, endopoligalacturonases (endoPGs), pectina liases,  $\alpha$  e  $\beta$ -galactopiranosidase,  $\alpha$ -arabinofuranosidase e proteases são enzimas secretadas e, provavelmente, provêm açúcar ao fungo durante a patogênese (HERBERT et al., 2004; WIJESUNDERA; BAILEY; BYRDE, 1984).

## 2.4 Metodologias para estudo da infecção

Diferentes metodologias e ferramentas foram utilizadas para investigar o processo de infecção. Além do uso de anticorpos monoclonais como citado anteriormente, a microscopia tem importância fundamental no estudo dos processos de infecção e colonização em fungos. Entre as mais utilizadas, destacam-se microscopia de luz (HOROWITZ et al., 2008; LATUNDE-DADA et al., 1999; LATUNDE-DADA; LUCAS, 2007; RECH; ENGH; KÜCK, 2007; SUGUI; DEISING, 2002; VERNARD; VAILLANCOURT, 2007) e microscopia eletrônica de varredura (MONEY; HOWARD, 1996; VENAULT-FOURREY et al., 2005; VENAULT-FOURREY; LAUGÉ; LANGIN, 2005) e de transmissão (O'CONNELL et al., 1996, 2000; PARK et al., 2004). Além destas, a microscopia de fluorescência tem sido empregada com sucesso por vários autores (DUMAS et al., 1999; HOROWITZ et al., 2008; O'CONNELL et al., 1996; VERNARD; VAILLANCOURT, 2007) e, da mesma forma, a microscopia laser confocal (HOROWITZ et al., 2008; HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002).

A descoberta das proteínas fluorescentes e sua aplicação no estudo da biologia celular trouxe vantagens para elucidar a infecção e a colonização em fungos, por meio da transformação de isolados e obtenção de mutantes com genes repórteres que expressam proteínas fluorescentes *green fluorescent protein* (GFP), *cyanin fluorescent protein* (CFP), *yellow fluorescent protein* (YFP) e *red fluorescent protein* (RFP). Esta técnica foi utilizada com sucesso em *C. acutatum* (HOROWITZ; FREEMAN; SHARON, 2002) e *C. graminicola* (VERNARD; VAILLANCOURT, 2007), entre outros patógenos (CZYMMEK et al., 2002; FREITAG et al., 2004). Utilizando a GFP sob o controle de um promotor constitutivo, a extensão e o tempo de curso da colonização do fungo

no tecido do hospedeiro podem ser observados diretamente, sem nenhuma coloração (O'CONNELL et al., 2000).

Além disso, esta técnica pode ser utilizada para estudar o comportamento sexual e segregação em fungos. Rech, Engh e Kück (2007) realizaram um estudo no qual isolados do fungo ascomiceto *Sordaria macrospora* foram transformados com vetores que codificam proteínas de histona H2B e H2A marcadas com as proteínas fluorescentes azul e amarela. Isso permitiu a marcação dos núcleos de diferentes isolados com cores distintas e a observação da fusão de hifas, núcleos e tipo de segregação dos ascósporos, por meio da microscopia de fluorescência.

Mais recentemente, microscopia confocal e isolados transformados com proteínas fluorescentes têm sido utilizados no estudo da biologia dos tubos de anastomoses entre conídios (*conidial anastomosis tubes*, ou CATs) em *C. lindemuthianum*, visando comprovar a ocorrência de recombinação genética na ausência do ciclo sexual, utilizando imagens de células *in vivo* (ISHIKAWA et al., 2010).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Origem e manutenção dos isolados

Os isolados anamórficos e teleomórficos de *C. lindemuthianum* utilizados neste estudo pertencem à Micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças, no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras e foram obtidos de lesões de antracnose em folhas e vagens de cultivares de feijão provenientes do campo (Tabela 1). Deve ser mencionado que os isolados teleomórficos foram obtidos do campo sem nenhuma indução, ou seja, meio específico ou nutriente (Figura 1).

Tabela 1 Isolados teleomórficos e anamórficos utilizados no estudo

<b>Isolado</b>	<b>Raça*</b>	<b>Fase</b>	<b>Origem</b>
UFLAG01	0	Teleomórfico	Guarapuava, PR
UFLAG02	0	Teleomórfico	Lavras, MG
UFLAG03	0	Teleomórfico	Ribeirão Vermelho, MG
UFLAG04	0	Teleomórfico	Ribeirão Vermelho, MG
UFLAG05	0	Teleomórfico	Ribeirão Vermelho, MG
UFLAG06	0	Teleomórfico	Ribeirão Vermelho, MG
UFLAG07	0	Teleomórfico	Lavras, MG
UFLAG08	0	Teleomórfico	Lavras, MG
LV 51	73	Anamórfico	Lavras, MG
LV77	81	Anamórfico	Lavras, MG
LV 115	65	Anamórfico	Patos de Minas, MG
LV 116	Não-patogênico	Anamórfico	Patos de Minas, MG
LV 117	65	Anamórfico	Lavras, MG
tQB01 <sup>a</sup>	-	Teleomórfico	Transformante, GFP
tQB02 <sup>b</sup>	-	Anamórfico	Transformante, GFP

\* Raça 0 = sintoma observado na cultivar Pérola

<sup>a</sup> isolado obtido da transformação (GFP) do isolado UFLAG06

<sup>b</sup> isolado obtido da transformação (GFP) do isolado LV115

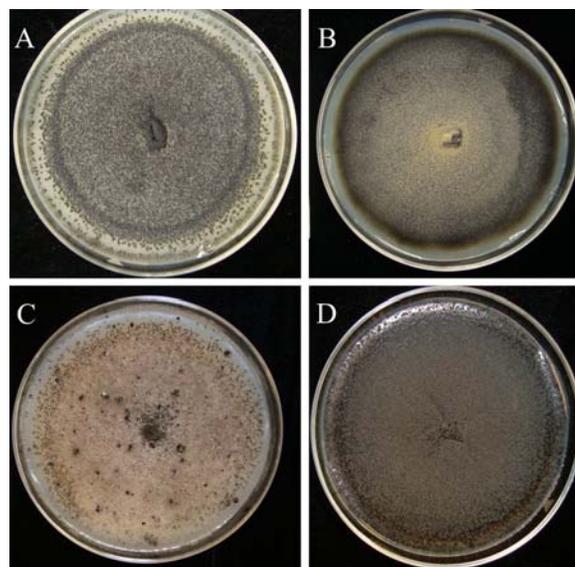


Figura 1 Colônias monospóricas obtidas a partir de ascósporos de isolado UFLAG06. (A) Colônia preta peritecial/conidial. (B) Colônia preta conidial. (C) Colônia branca peritecial e (D) colônia preta estéril

Todos os isolados foram submetidos à purificação genética pela obtenção de culturas monospóricas de conídios e ascósporos. Os isolados foram mantidos em meio de cultura M3 (JUNQUEIRA et al., 1984). Para esporulação, os isolados anamórficos foram transferidos para vagens de feijão esterilizadas parcialmente imersas em ágar a 2% em tubos de ensaio, incubadas a  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , por 15-20 dias, no escuro. Os isolados teleomórficos formaram peritécios férteis com ascósporos após 25 dias de cultivo em meio M3.

Para a obtenção das suspensões, os conídios ou ascósporos foram coletados em água destilada, deionizada e estéril. As suspensões foram filtradas e, posteriormente, os esporos foram lavados com uma série de três centrifugações e ressuspensões em água estéril.

### **3.2 Análise da germinação e eventos de pré-penetração de conídios e ascósporos**

Com o objetivo de caracterizar e comparar as taxas de germinação de esporos e acompanhar eventos de pré-penetração entre isolados anamórficos e teleomórficos, foram realizados experimentos de germinação *in vitro* e *in vivo*.

#### **3.2.1 Análise da germinação *in vitro***

Foi conduzido um experimento no delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 13 x 3, com três repetições. Foram avaliados os isolados (Tabela 1, exceto transformantes), em três tempos: 6, 12 e 24 horA. A germinação foi avaliada em suspensão de esporos de conídios ou ascósporos na concentração de  $5 \times 10^5$  esporos/ml em lâminas escavadas, incubadas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , que foram observadas em microscópio de contraste de fase (Leica DMLS, Wetzlar, Germany), nos três tempos. Cada parcela foi constituída de uma amostra de 100 esporos avaliados quanto à germinação. Dessa forma, obteve-se a porcentagem de cada amostra. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o programa MSTATC e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade.

#### **3.2.2 Análise da germinação *in vivo***

As cultivares suscetível (Pérola) e resistente (G2333) foram semeadas em bandejas de poliestireno contendo substrato Plantmax® (Eucatex, Paulina, São Paulo, Brasil). As plântulas foram coletadas para utilização das folhas primárias, sendo estas destacadas e dispostas em placas de Petri com papel umedecido.

Os esporos foram coletados como descrito no item 3.1 e a suspensão de esporos ajustada para a concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml. Posteriormente, foram depositadas gotas de 5  $\mu$ L de solução de esporos ao longo das folhas e estas foram incubadas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ . Para as avaliações, os tecidos foliares foram clareados utilizando-se o método descrito por Ryan e Clare (1974) modificado. Desse modo, pedaços de folhas (aproximadamente de 1  $\text{cm}^2$ ) foram colocados em placas de Petri contendo papel filtro umedecido com solução de ácido acético e etanol (1:1 v/v), por 48 horas. As folhas foram transferidas para papel filtro umedecido com água esterelizada, por 30 minutos. Posteriormente, foram montadas lâminas com os pedaços de folhas clareadas, utilizando-se uma gota de solução 67 Mm  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 9,0), contendo 0,1% de azul de anilina e glicerol a 50% e observadas em microscópio de contraste de fase (Leica DMLS, Wetzlar, Germany).

O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial  $2 \times 2 \times 2$  com três repetições. Foram avaliados os ascósporos do isolado teleomórfico UFLAG03 e os conídios do isolado anamórfico LV117 em dois tempos: 24 e 48 horas, nas cultivares suscetível (Pérola) e resistente (G2333). Cada parcela foi constituída de uma amostra de cem esporos avaliados quanto à germinação e à formação de apressórios. Dessa forma, obteve-se a porcentagem de cada amostra. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância utilizando o programa MSTATC e as médias foram comparadas pelo teste de Scott e Knott (1974), a 5% de probabilidade.

### **3.2.3 Análise dos eventos precedentes à penetração e MEV**

Os ascósporos dos isolados teleomórficos UFLAG01 e UFLAG06 e os conídios do isolado LV117 foram inoculados na cultivar susceptível Pérola, na concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml. A cada período de incubação (24, 48, 72,

96 e 120 horas), amostras de folhas foram preparadas para MEV, fixando-as por 48 horas em solução Karnovsky modificada [2,5% glutaraldeído e 2,5% formaldeído em tampão 0,05 M cacodilato de sódio (pH 7,2) contendo 0,001 M de clorato de cálcio], lavando-as em tampão de 0,05 M cacodilato de sódio (pH 7.2) e fixando-as, por 1 hora, com 1% de tetróxido de ósmio em tampão cacodilato de sódio, à temperatura ambiente. Para a fixação seguinte, amostras de folhas foram desidratadas em água e gradiente de acetona com concentrações de acetona de 25% 50%, 75%, 90% e 100%. A exposição a cada etapa foi de 10 minutos e a etapa a 100% foi repetida três vezes. A acetona foi removida em secador de ponto crítico Bal-Tec modelo CPD 030 (Balzers, Liechtenstein). As amostras foram fixadas em suportes de alumínio com fita dupla face adesiva de carbono e cobertas sob vácuo com uma fina camada de ouro metálico, utilizando um evaporador Bal-Tec modelo SCD 050. O sistema Nano Technology (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) modelo Evo® 40 VP MEV foi utilizado com uma aceleração de voltagem de 20 kV e distância de trabalho de 9 mm para a obtenção de imagens a várias magnitudes. As imagens foram processadas utilizando o programa Corel Draw 9 Photopaint Software (Corel Corporation, Ottawa, Canada).

### **3.3 Análise dos eventos pós-penetração**

A fim de acompanhar e comparar os eventos pós-penetração realizados por conídios e ascósporos, e também buscando elucidar as causas da diferença observada na sintomatologia, foram realizados experimentos utilizando isolados selvagens e transformados, observados por meio da microscopia de luz e fluorescência.

### 3.3.1 Transformação de isolados

Para a obtenção de transformantes expressando da proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP) os isolados LV115, LV117, UFLAG06 e UFLAG08 foram transformados com o método de transformação mediado por *Agrobacterium tumefaciens* (FLOWERS; VAILLANCOURT, 2005). O plasmídeo utilizado pJF1 contém o gene *SGFP*, os elementos do promotor de *Pyrenophora tritici-repentis* promotor TOX-A e o gene de higromicina como marcador seletivo, ou seja, os mesmos elementos do plasmídeo pCT74 (FLOWERS; VAILLANCOURT, 2005; LORANG et al., 2001). Os transformantes foram selecionados em meio BDA com 50 µg/ml de higromicina B e purificados pela obtenção de culturas monospóricas de conídios e ascósporos.

### 3.3.2 Inoculações com isolados selvagens e obtenção de amostras

Foram realizados experimentos inoculando-se os conídios do isolado selvagem anamórfico LV115 e os ascósporos do isolado teleomórfico UFLAG06 em folhas e hipocótilos das cultivares de feijoeiro suscetível Pérola e da cultivar resistente G2333. As folhas e hipocótilos destacados foram dispostos em placas de Petri com papel umedecido. Os esporos foram coletados como descrito no ítem 3.1 e a suspensão de esporos ajustada para concentração de  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml. Posteriormente, foram depositadas gotas de 5 µL de solução de esporos ao longo dos tecidos e incubou-se a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , para as avaliações às 72, 96 e 120 horas após a inoculação.

Para facilitar a observação da infecção por microscopia de luz, foi realizado o clareamento dos tecidos vegetais. Para isso, foram obtidas amostras recortando-se os tecidos vegetais em secções de  $1 \text{ cm}^2$  nos locais de infecção.

Posteriormente, as amostras foram imersas em solução de ácido acético:etanol (1:3), por 1 hora e, em seguida, transferidas para solução de ácido acético:etanol: glicerol (1:5:1), por 1 hora. A coloração das amostras depois de clareadas foi realizada com Azul de Tripán (250 µg/ml) em solução de lactofenol (ácido láctico: fenol: H<sub>2</sub>O 1: 1: 1), por 10 minutos e transferidos para lactonol, por 1 hora. As amostras foram analisadas em lâminas com secções de tecido vegetal em glicerol 50% e observadas em microscópio Zeiss Axioscop com o programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

Foram realizadas contagens para a formação de apressórios às 72 horas após a infecção em experimento realizado com os conídios do isolado selvagem LV115 e ascósporos do isolado selvagem UFLAG06 inoculados em cultivares suscetível (Michelite) e resistente (G2333). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado (DIC), em esquema fatorial 2 x 2, com três repetições. Cada parcela foi constituída de uma amostra de 100 esporos, obtendo-se a porcentagem. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o programa MSTATC.

### **3.3.3 Inoculações com isolados transformantes**

Os ascósporos do isolado transformado teleomórfico (tQB01) e os conídios do isolado transformado anamórfico (tQB02) foram inoculados em hipocótilos da cultivar suscetível (Pérola) e resistente (G2333). As folhas e os hipocótilos destacados foram dispostos em placas de Petri com papel umedecido. Os esporos foram coletados como descrito no item 3.1 e a suspensão de esporos ajustada para  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml. Posteriormente, foram depositadas gotas de 5 µL de solução de esporos ao longo das folhas e incubadas a  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , para as avaliações às 72, 96 e 120 horas após a inoculação.

Com objetivo de analisar o processo de infecção do isolado teleomórfico durante a morte celular, foi realizado um experimento em que ascósporos do isolado transformante tQB01 foi inoculado em hipocótilos e folhas das cultivares suscetível (Pérola) e resistente (G2333). A morte celular foi provocada encostando-se pequenos pedaços de gelo seco ao longo dos tecidos vegetais por cerca de 3 segundos, com auxílio de uma pinça. Após esse processo, foram inoculadas gotas da solução de esporos nos pontos em que foi causada a morte celular. As avaliações ocorreram às 24, 48 e 72 horas após a inoculação.

As amostras foram analisadas em lâminas com secções finas de tecido vegetal em glicerol 50% e observadas em microscópio Zeiss Axioscop, com o programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### **3.3.4 Coinoculações com isolados anamórficos e teleomórficos**

Foi realizado um experimento de coinoculação em que isolados selvagens e transformantes foram inoculados em hipocótilos da cultivar suscetível Pérola nas seguintes combinações: 1) conídios do isolado anamórfico selvagem (LV115) + ascósporos do teleomórfico transformante (tQB01) e 2) ascósporos do isolado teleomórfico selvagem (UFLAG06) + conídios do isolado anamórfico transformante (tQB02). Os controles para este experimento foram: 1) conídios do isolado anamórfico selvagem inoculado na cultivar suscetível; 2) ascósporos do isolado teleomórfico selvagem inoculado na cultivar suscetível e 3) controle inoculado com água estéril na cultivar suscetível.

As soluções de esporos foram obtidas como descrito no ítem 3.1 e a concentração foi ajustada para  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml. Posteriormente, as soluções foram misturadas e inoculadas gotas de 5  $\mu$ L, ao longo dos hipocótilos em placas de Petri com papel umedecido. A avaliação foi realizada 120 horas após a

inoculação. As amostras foram analisadas em lâminas com secções finas de tecido vegetal em glicerol 50% e observadas em microscópio Zeiss Axioscop, com o programa AxioVision 4.8 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

### **3.4 Testes de patogenicidade**

Visando identificar a raça de isolado teleomórfico, este foi inoculado no conjunto de doze diferenciadoras de feijão (CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL - CIAT, 1990). Para isso, dezesseis sementes de cada uma das cultivares diferenciadoras e da cultivar Pérola (suscetível) foram semeadas em bandejas de poliestireno (128 células cada) contendo o substrato comercial Plantmax®. Foram inoculados ascósporos do isolado teleomórfico (UFLAG01) e os conídios do anamórfico (LV117). As plântulas foram pulverizadas com 200 ml de suspensão de esporos ( $1,2 \times 10^6$  esporos/ml) e a bandeja foi colocada em câmara de nebulização por 72 horas à temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 horas no escuro/12 horas de luz. Posteriormente, as bandejas foram transferidas para casa de vegetação e, depois de 10 dias, foram avaliadas quanto à severidade da antracnose, utilizando uma escala de 1 a 9, sendo as plântulas com notas de 1 a 3 consideradas resistentes e as com notas de 4 a 9, suscetíveis (SCHOONHOVEN; PASTOR-CORRALES, 1987). O sistema binário de Habgood (1970) foi utilizado na identificação das raças.

A partir das colônias teleomórficas dos isolados UFLAG06 e UFLAG08, foram obtidas colônias monospóricas pretas conidiais e brancas que formam ascósporos e conídios. As colônias conidiais e ascospóricas foram inoculadas separadamente em hipocótilos destacados de duas cultivares suscetíveis, Pérola e Michelite. Os isolados utilizados foram: UFLAG067.5 (colônia branca que forma ascósporos e conídios), UFLA067.1 (preta conidial), UFLAG0815.1 (branca com formação de ascósporos e conídios) e

UFLAG0811.1 (preta conidial). Foram utilizados como controle o isolado anamórfico LV115 inoculado nas duas cultivares e o controle com água estéril nas duas cultivares.

Foram realizadas suspensões de esporos como mencionado no item 3.1 e a concentração foi ajustada para  $1,2 \times 10^6$  esporos/ml, para todos os isolados. As inoculações foram realizadas depositando-se gotas de 5  $\mu$ l de suspensão de esporos em hipocótilos destacados dispostos em placas de Petri com papel umedecido. As imagens dos sintomas foram obtidas dez dias após as inoculações.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Ascósporos germinam mais rápido do que conídios *in vitro*

Os dados de germinação de ascósporos e conídios dos isolados avaliados *in vitro* estão apresentados na Tabela 2. Todas as fontes de variação da análise de variância foram significativas ( $P < 0,0001$ ), inclusive a interação isolado x tempo. Portanto, o teste de médias foi utilizado nas médias em cada tempo. Verifica-se, de modo geral, que os isolados da fase anamórfica formaram um único grupo, ou seja, não houve diferenças de germinação entre esses isolados. O mesmo comportamento se observa para os isolados teleomórficos. Às 6 horas, o isolado UFLAG07 mostrou baixa taxa de germinação, sendo agrupado com os isolados anamórficos. Já às 12 horas de incubação, os isolados teleomórficos formaram três grupos diferentes.

Foi demonstrado, portanto, que a germinação de ascósporos ocorreu antes da de conídios *in vitro*.

Tabela 2 Porcentagem de germinação de ascósporos e conídios de isolados de *C. lindemuthianum* às 6, 12 e 24 horas de incubação em água

Isolados	% germinação de esporos					
	6 horas		12 horas		24 horas	
UFLAG01 (ascósporos)	10,33 ±6,40 <sup>a</sup>	<b>B*</b>	9,16 ±5,35	<b>B</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG02 (ascósporos)	6,57 ±5,89	<b>B</b>	11,00 ±7,02	<b>B</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG03 (ascósporos)	6,89 ±1,89	<b>B</b>	9,94 ±4,63	<b>B</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG04 (ascósporos)	10,33 ±4,91	<b>B</b>	22,31 ±16,01	<b>C</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG05 (ascósporos)	7,78 ±4,29	<b>B</b>	14,78 ±6,91	<b>B</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG06 (ascósporos)	16,22 ±9,63	<b>B</b>	37,89 ±22,22	<b>D</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG07 (ascósporos)	4,67 ±1,66	<b>A</b>	11,45 ±2,54	<b>B</b>	100,00	<b>B</b>
UFLAG08 (ascósporos)	15,00 ±17,03	<b>B</b>	19,67 ±25,54	<b>C</b>	100,00	<b>B</b>
LV51 (conídios)	1,44 ±0,50	<b>A</b>	2,00 ±0,33	<b>A</b>	2,89 ±0,19	<b>A</b>
LV77 (conídios)	0,11 ±0,19	<b>A</b>	0,44 ±0,19	<b>A</b>	2,33 ±0,33	<b>A</b>
LV115 (conídios)	0	<b>A</b>	1,11 ±1,92	<b>A</b>	2,44 ±2,22	<b>A</b>
LV116 (conídios)	0	<b>A</b>	1,00	<b>A</b>	3,67 ±1,88	<b>A</b>
LV117 (conídios)	0	<b>A</b>	1,16 ±0,23	<b>A</b>	1,33 ±0,46	<b>A</b>

<sup>a</sup>Médias e desvios padrões

\*Médias com a mesma letra não são significativamente diferentes, de acordo com o teste de Scott-Knott, a 5%

#### 4.2 Ascósporos e conídios germinam e formam apressórios na superfície de folhas

Os dados obtidos da análise de germinação de esporos *in vivo* estão descritos na Tabela 3. Todas as fontes de variação da análise de variância foram significativas ( $P < 0,001$ ). A maioria dos ascósporos do isolado UFLAG03 germinaram em folhas das cultivares resistente (75,66%) e suscetível (76,33%), 24 horas após a inoculação. A média das porcentagens de germinação do isolado UFLAG03 foi significativamente diferente ( $P < 0,0001$ ) do isolado patogênico (LV117). Após 48 horas das inoculações, quase 100% dos ascósporos germinaram, enquanto poucos conídios do controle patogênico germinaram.

O isolado teleomórfico UFLAG03 exibiu uma porcentagem de germinação semelhante nas cultivares suscetível e resistente (Tabela, 3). Porém, o mesmo não foi observado para o isolado anamórfico LV117, o qual exibiu alta porcentagem de germinação na cultivar suscetível e baixa na resistente. Todos os isolados avaliados desenvolveram apressórios (Gráfico 1).

Tabela 3 Germinação de ascósporos e conídios e formação de apressórios em duas cultivares de feijoeiro, Pérola (suscetível) e G2333 (resistente)

Isolado	Esporos germinados (%)*			
	Pérola		G2333	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
UFLAG03	76,33±17,47	97,66±2,51	75,66±6,43	98,33±1,52
LV117	9,33±8,32	4,6±5,68	2±1,73	1,33±1,15
Isolado	Esporos germinados formando apressórios (%)*			
	Pérola		G2333	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
UFLAG03	63,7±12,74	96,33±1,15	65,7±8,37	97,33±2,08
LV117	9,33±8,32	4,6±5,68	2±1,73	1,33±1,15

\*Média e desvio padrão

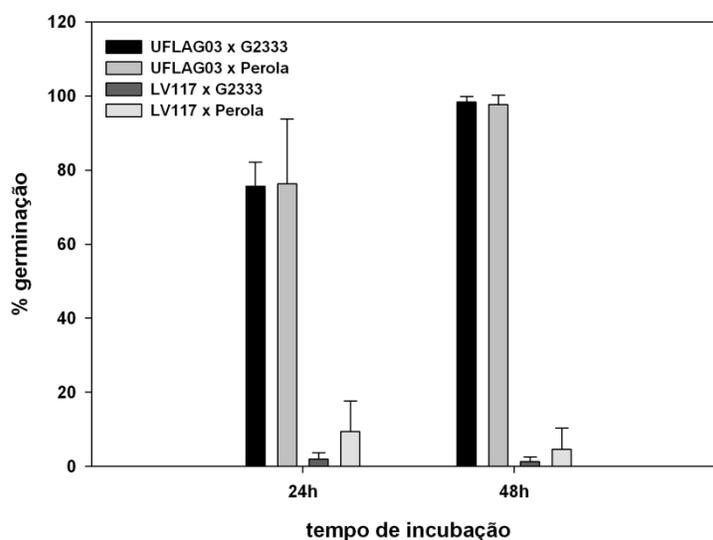


Gráfico 1 Porcentagem da germinação de ascósporos e conídios na cultivar resistente (G2333) e na susceptível (Pérola), 24 e 48 horas após a inoculação

A formação de dois apressórios nas extremidades dos ascósporos ou no final de tubos germinativos foi tipicamente observada para o isolado teleomórfico (Figuras, 2a e 3a). Esse fenótipo morfológico foi observado pela primeira vez neste estudo, pois não há relatos de formação de dois apressórios por esporo em isolados anamórficos ou teleomórficos de *C. lindemuthianum*. Após 72 horas da infecção, não foi possível quantificar a porcentagem de germinação e formação de apressório, devido à intensa produção de micélio na superfície das folhas. Foi possível, no entanto, quantificar a germinação conidial do isolado LV117 na cultivar resistente (1.8%), em que as diferenças de comportamento nas cultivares resistente e suscetível foram claras.

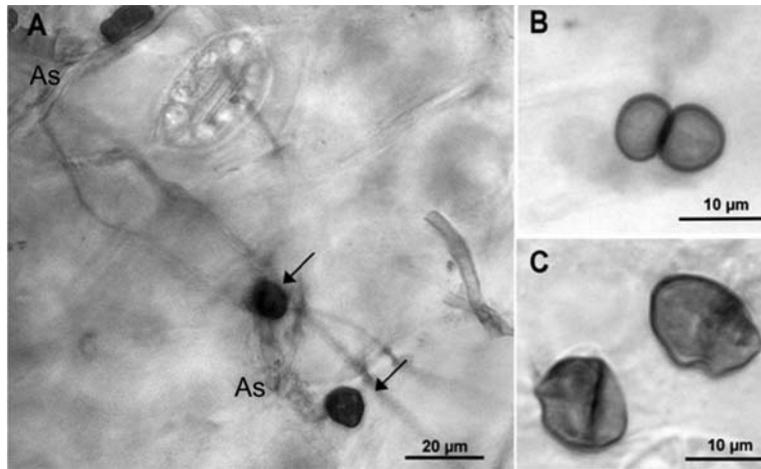


Figura 2 Tubos germinativos e apressórios de conídios e ascósporos em células epidermais de folhas de feijoeiro coradas com azul de anilina, 24 horas após inoculação. (A) e (C) Formação de dois apressórios nas extremidades do ascósporo do isolado teleomórfico UFLA03. (B) Apressórios esféricos emitidos por conídios do isolado anamórfico LV117

Observações por MEV em folhas inoculadas com ascósporos do isolado teleomórfico UFLAG01 demonstraram que houve crescimento mais vigoroso às 24 e às 48 horas do que o observado em inoculações utilizando conídios do isolado anamórfico (LV117). Estas observações confirmaram os resultados de microscopia de luz. Adicionalmente, durante esse período, a produção de micélio, a emergência de tubos de germinação em ascósporos e a formação de apressórios puderam ser detectadas (Figuras, 3a–c). Todas estas estruturas foram observadas às 72 horas após a inoculação, para o isolado UFLAG01 (Figura, 3d) e UFLAG06 (Figura, 5), enquanto que, após 96 e 120 horas, somente micélio foi observado. Apressórios foram formados pelos esporos teleomórficos e anamórficos.

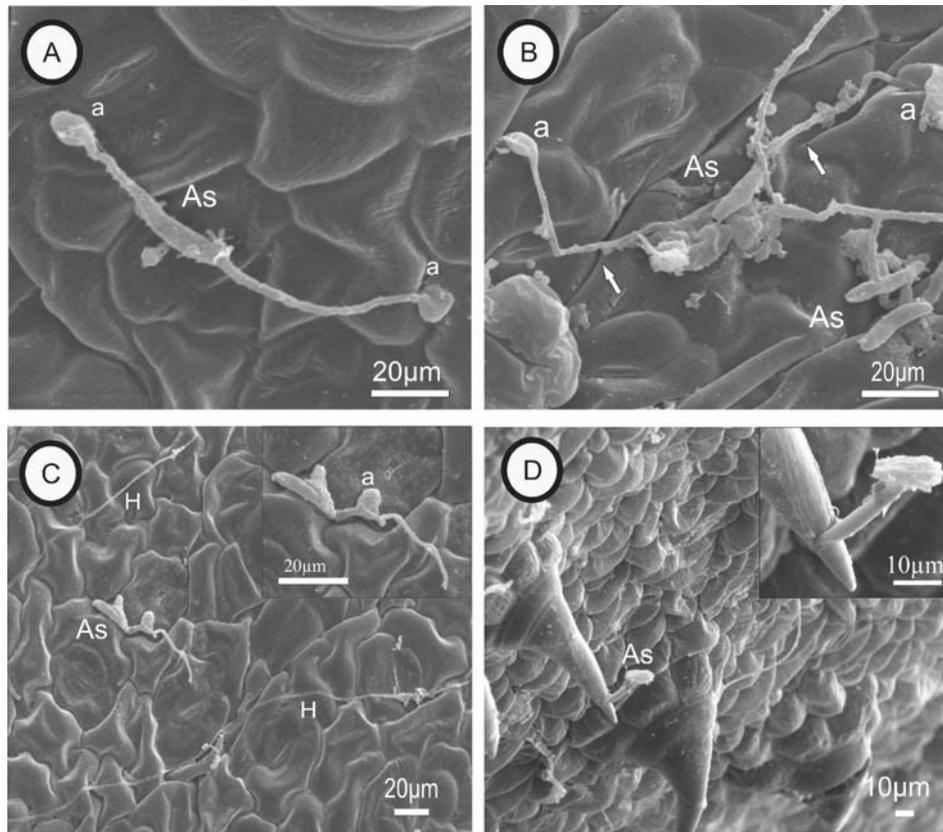


Figura 3 Microscopia eletrônica de varredura da superfície das folhas do feijão (cultivar Pérola) após a inoculação com isolado teleomórfico UFLAG01: (A) 24 horas após inoculação, mostrando ascósporos (As) emitindo tubos germinativos, apressórios (a) e desenvolvimento de hifas (H); (B) e (C) 48 horas após a inoculação, mostrando ascósporos (As) com tubos germinativos (setas brancas), hifas (H) e apressórios (a) [em (C), detalhes foram ampliados na imagem]; (D) 72 horas após a inoculação, mostrando ascósporos com apressórios (detalhes são ampliados acima, à direita)

Análises em MEV do material foliar coletado às 24 e às 48 horas após a inoculação com isolado anamórfico revelaram que o fungo cresceu lentamente e que um grande número de conídios não germinou, além da formação de poucos tubos germinativos e apressórios (Figuras 4a e b). Após 48 e 72 horas, foi

possível observar tubos de anastomoses entre conídios (CAT) (Figura, 4c), tubos germinativos e apressórios emergindo de conídios (Figura, 4d). Após 96 e 120 horas, foi observado grande crescimento micelial na superfície das folhas.

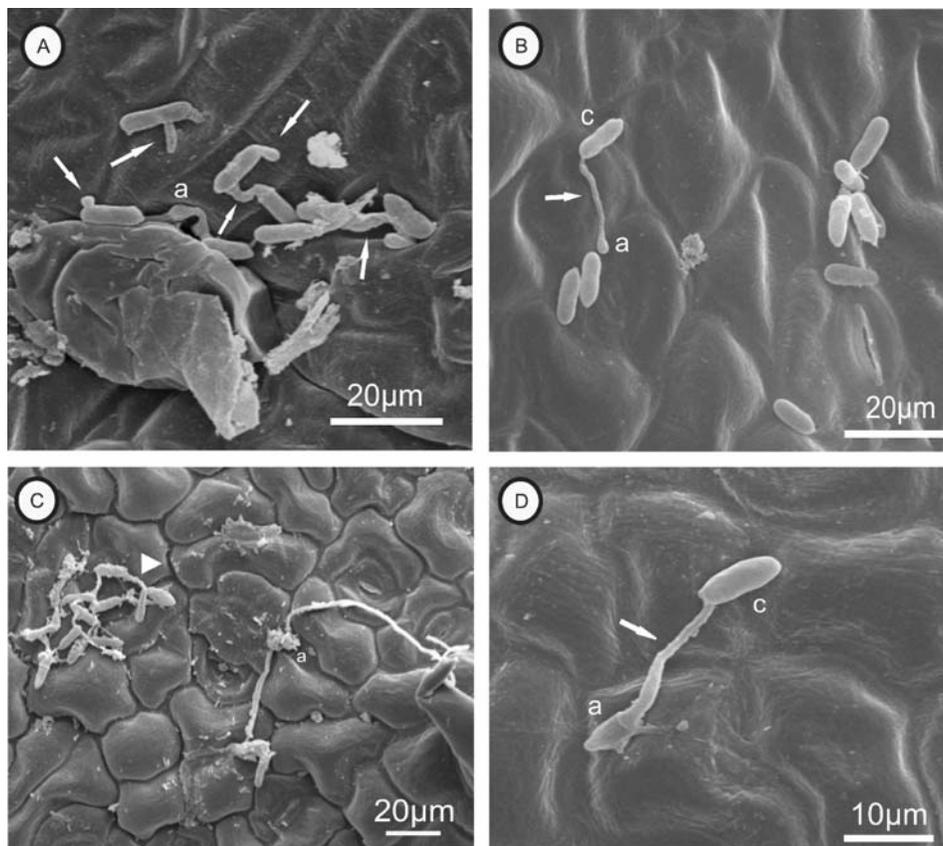


Figura 4 Microscopia eletrônica de varredura da superfície de folhas do feijoeiro (cultivar Pérola) após a inoculação com isolado anamórfico LV 117: (A) 24 horas após a inoculação, mostrando conídios emitindo tubos germinativos (setas brancas) e apressórios (a); (B) 24 horas após inoculação, mostrando vários conídios não germinados, conídios (c) emitindo tubos germinativos (seta branca) e apressório (a); (C) 72 horas após a inoculação, mostrando conídios formando cadeia de anastomoses (seta branca) e (D) 72 horas após inoculação, mostrando conídios com tubos germinativos (seta branca) e apressórios (a)

Portanto, observa-se que a diferença no tempo para a germinação do esporo observada na análise *in vitro* se repetiu na análise *in vivo* e para as análises por MEV. Adicionalmente, foi demonstrado que a formação de apressórios dos isolados teleomórficos ocorre antes e de forma mais intensa do que para isolados anamórficos, tanto na cultivar suscetível como resistente.

Outro aspecto interessante observado nas análises de pré-infecção é que os isolados teleomórficos se comportam de maneira semelhante nas duas cultivares, não sendo influenciado pela resistência do hospedeiro.

Já o isolado anamórfico exibiu maior porcentagem de germinação de conídios na cultivar suscetível do que na resistente e foram observados apressórios não melanizados na superfície da cultivar resistente. Este comportamento era esperado, já que a cultivar resistente utilizada faz parte das cultivares diferenciadoras utilizadas para identificação de raças (CIAT) e tem muitos alelos de resistência. Estes resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Jerba, Rodella e Furtado (2005), no qual o número de apressórios formados por isolados anamórficos durante os estágios iniciais da infecção foi maior na cultivar suscetível do que na resistente.

A reação do hospedeiro pode prejudicar o desenvolvimento do patógeno. Este fato foi verificado na avaliação de um isolado de *C. destructivum* inoculado em duas cultivares de feijão-caupi, uma suscetível e uma resistente à antracnose. Na superfície do hospedeiro resistente, muitos tubos germinativos falharam em desenvolver apressórios e parte dos que desenvolveram não desenvolveram a melanização. Além disso, a cutícula do hospedeiro resistente foi significativamente menos penetrada até mesmo pelos apressórios melanizados. Os autores enfatizam que essas falhas no desenvolvimento durante a pré-penetração podem ser devido à presença de inibidores constitutivos na cutícula da cultivar resistente, caracterizando um tipo de resistência à raça não-específica ou resistência de não-hospedeira (LATUNDE-DADA et al., 1999).

Em espécies de *Colletotrichum*, a formação de apressórios é importante para a penetração do patógeno pela célula da planta e o subsequente desenvolvimento da doença. Todavia, existem exemplos, tais como a invasão de amoreiras por *C. gloesporioides* (KUMAR et al., 2001), na qual o fungo não produz apressório. Porém, no caso de *C. lindemuthianum*, a penetração ocorre diretamente pela cutícula da folha como consequência da pressão exercida pelo apressório. Este é o primeiro relato sobre mecanismos de penetração de isolados teleomórficos de *C. lindemuthianum*, em células de feijoeiro, sendo observada a intensa formação de apressórios (Figura, 5a-d). A presença de pigmentos de melanina nos apressórios foi verificada para os isolados anamórficos e teleomórficos (Figura, 2a-c). A penetração através de estômatos não foi observada.

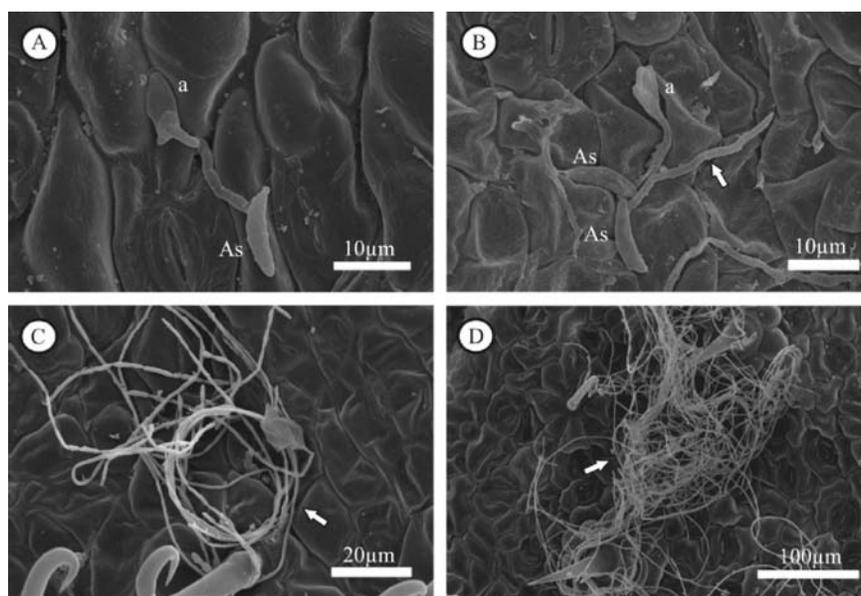


Figura 5 Microscopia eletrônica de varredura da superfície das folhas do feijão (cultivar Pérola) após a inoculação com isolado teleomórfico UFLAG06: (A) e (B) 72 horas após inoculação, mostrando ascósporos (As) emitindo tubo germinativo (seta branca), apressórios (a) (C) e (D) 72 horas após a inoculação, mostrando hifas (setas brancas) na superfície de folhas

### **4.3 Isolados teleomórficos causam sintomas brandos no feijoeiro *in vivo* e não causaram sintomas em hipocótilos *in vitro***

Nos testes de patogenicidade com a cultivar comercial Pérola, a mesma foi suscetível ao isolado teleomórfico (UFLAG01) e anamórfico (LV117) com diferenças nos sintomas.

Os resultados da identificação de raças mostraram que nenhuma das doze cultivares diferenciadoras utilizadas no estudo foi suscetível ao isolado teleomórfico UFLAG01 utilizado. O isolado LV117 foi classificado como raça 65. Plantas inoculadas com ascósporos mostraram sintomas brandos (nota = 4,5) quando comparados àqueles normalmente associados com inoculações utilizando conídios. As lesões foram observadas na nervura principal das folhas e lesões nos hipocótilos foram praticamente invisíveis (Figura, 6a–e).

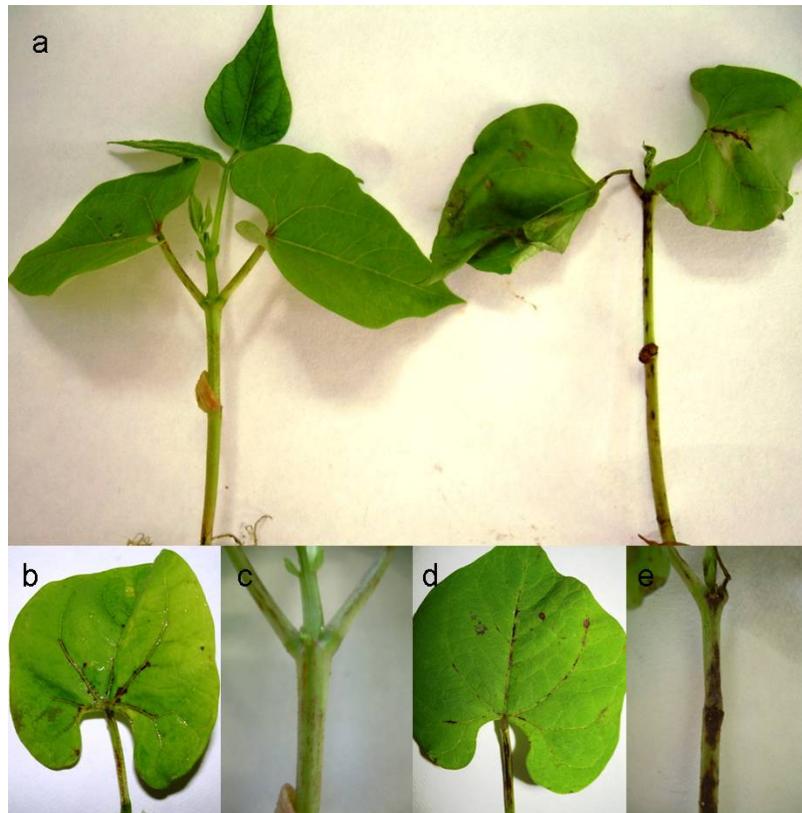


Figura 6 Sintomas de antracnose aos dez dias após a inoculação. (a) Plantas de feijão inoculadas com ascósporos do isolado teleomórfico (UFLAG01) à esquerda e inoculadas com conídios do isolado anamórfico (LV117) à direita; (b) e (c) sintomas em folhas e hipocótilos inoculados com o isolado teleomórfico; (d) e (e) sintomas em folhas e hipocótilos inoculados com o isolado anamórfico

Os resultados do experimento *in vitro* mostram que não houve o desenvolvimento de sintomas em hipocótilos de feijoeiro quando as colônias conidiais e ascospóricas obtidas de monospóricas dos isolados teleomórficos (UFLAG06 e UFLAG08) foram inoculadas nas cultivares suscetíveis. Somente o isolado anamórfico LV115 desencadeou a formação de sintomas típicos de antracnose em ambas as cultivares (Figuras 7 e 8).

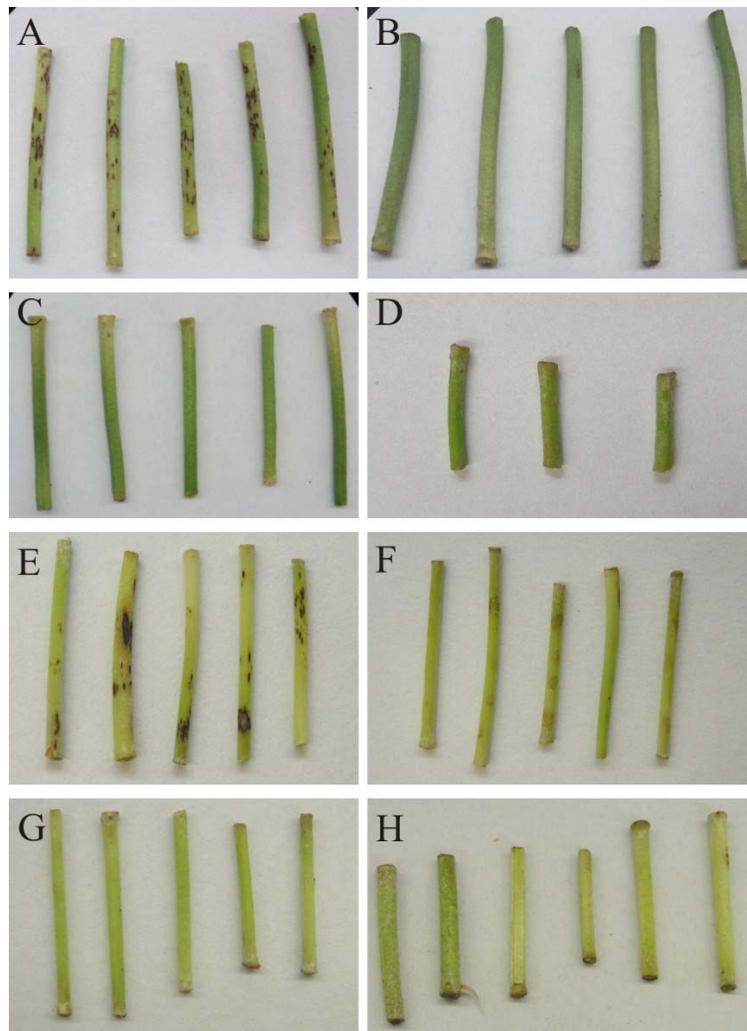


Figura 7 Sintomas de antracnose aos dez dias apos a inoculação em hipocótilos. (A) Isolado LV115 inoculado na cultivar Pérola. (B) Isolado UFLAG067.5 (ascosporos e conídios) inoculado na cultivar Pérola. (C) Isolado UFLAG06 7.1 (conidial) inoculado na cultivar Pérola. (D) Controle inoculado com água na cultivar Pérola. (E) Isolado LV115 inoculado na cultivar Michelite. (F) Isolado UFLAG067.5 (ascósporos e conídios) inoculado na cultivar Michelite. (G) Isolado UFLAG067.1 (conidial) inoculado na cultivar Michelite. (H) Controle inoculáado com água na cultivar Michelite

Portanto, os resultados deste estudo mostram que ascósporos dos isolados teleomórficos podem germinar e formar apressórios em cultivares de feijoeiro, porém, não causam sintomas característicos da antracnose. Esses resultados estão de acordo com os resultados obtidos por Camargo Júnior et al. (2007), no qual os sintomas de antracnose em plantas inoculadas com ascósporos do isolado teleomórfico foram brandos quando comparados àqueles apresentados por plantas inoculadas com conídios do isolado anamórfico.

Outro aspecto importante sobre a sintomatologia é que, nos pontos nos quais foram depositadas as gotas de inóculo em hipocótilos, em algumas amostras (Figura, 7F) desenvolveu-se uma mancha de cor marrom-clara. Na observação dessas manchas sob microscopia de luz, pôde-se verificar a intensa formação de hifas e apressórios. Portanto, é possível que, em algumas ocasiões, essas manchas sejam também reconhecidas como sintomas brandos, como relatado anteriormente.



Figura 8 Sintomas de antracnose aos dez dias após a inoculação em hipocótilos. (A) Isolado LV115 inoculado na cultivar Pérola. (B) Isolado UFLAG0815.1 (ascosporos e conídios) inoculado na cultivar Pérola. (C) Isolado UFLAG0811.1 (conidial) inoculado na cultivar Pérola. (D) Controle inoculado com água na cultivar Pérola. (E) Isolado LV115 inoculado na cultivar Michelite. (F) Isolado UFLAG0815.1 (ascosporos e conídios) inoculado na cultivar Michelite. (G) Isolado UFLAG0811.1 (conidial) inoculado na cultivar Michelite. (H) Controle inoculado com água na cultivar Michelite

#### 4.4 Isolado teleomórfico exibe comportamento epifítico e oportunista no feijoeiro

Os experimentos utilizando isolados selvagens anamórfico e teleomórfico (LV115 e UFLAG06) demonstraram resultados que concordam com os obtidos na análise da pré-infecção, ou seja, o isolado teleomórfico germinou e formou mais apressórios e hifas na superfície de hipocótilos do que o isolado anamórfico, às 72 horas após a inoculação (Tabela 4). Todas as fontes de variação da análise de variância foram significativas ( $P < 0,001$ ).

As estruturas pós-penetração como vesícula de infecção e hifas primárias foram encontradas para o isolado anamórfico às 72 horas após a infecção na cultivar suscetível (Figura, 9). No entanto, para o isolado teleomórfico, não foram encontradas estas estruturas às 72 horas e nem mesmo nos tempos mais avançados após a inoculação (96 e 120 horas), utilizando-se tanto a microscopia de luz como a de fluorescência.

Tabela 4 Germinação de conídios e ascósporos e formação de apressórios nas cultivares Pérola (susceptível) e G2333 (resistente) de feijoeiro, 72 horas após a inoculação

Isolado	Esporos germinados formando apressórios (%)*	
	LV 115	UFLAG06
Pérola	15±1,73	98,33±1,52
G2333	4±1	97±3

\*Média e desvio padrão

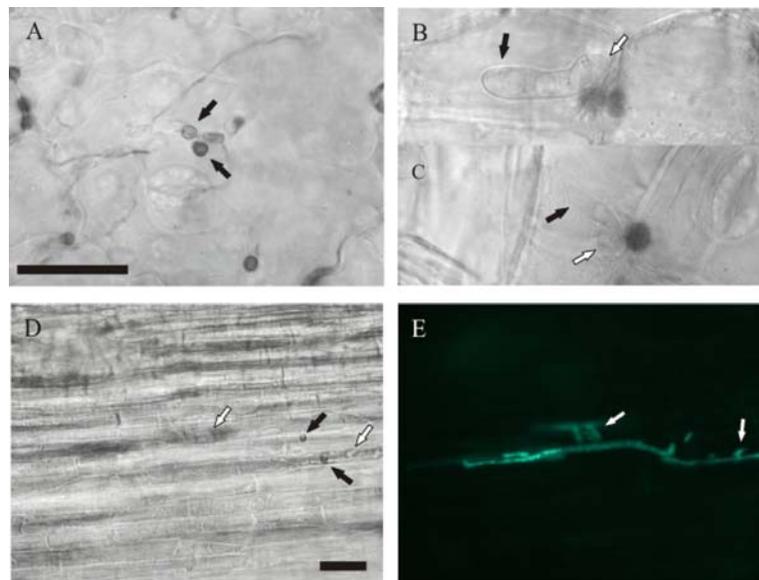


Figura 9 (A) Isolado anamórfico (LV115) na cultivar resistente, apressórios (setas). (B) e (C) Isolado anamórfico (LV115) na cultivar suscetível, formando vesículas de infecção (setas brancas) e hifas primárias (setas pretas). (D) Isolado anamórfico (LV115) na cultivar suscetível, formando apressórios (setas pretas) e hifas primárias (setas brancas). (E) Mesma imagem por microscopia de fluorescência, hifas do isolado transformante expressando GFP. Todas as imagens foram obtidas 72 horas após a inoculação. Barra: 10  $\mu$ m

Todavia, no experimento de inoculação do isolado teleomórfico transformante (tQB01) em pontos nos quais a morte celular foi induzida, o mesmo teve habilidade de desenvolver hifas com diâmetro grande, características de hifas primárias, no interior das células mortas (48 horas), formando acérvulos em folhas às 72 horas (Figura 10). Para os isolados anamórficos, não foram observados acérvulos neste tempo e nem mesmo em tempos mais avançados (124 horas), de acordo com relatos da literatura para *C. lindemuthianum* de que a formação de acérvulos rompendo a camada da epiderme vegetal é evidente em aproximadamente dez dias após a penetração (PERFECT; GREEN; O'CONNELL, 2001).

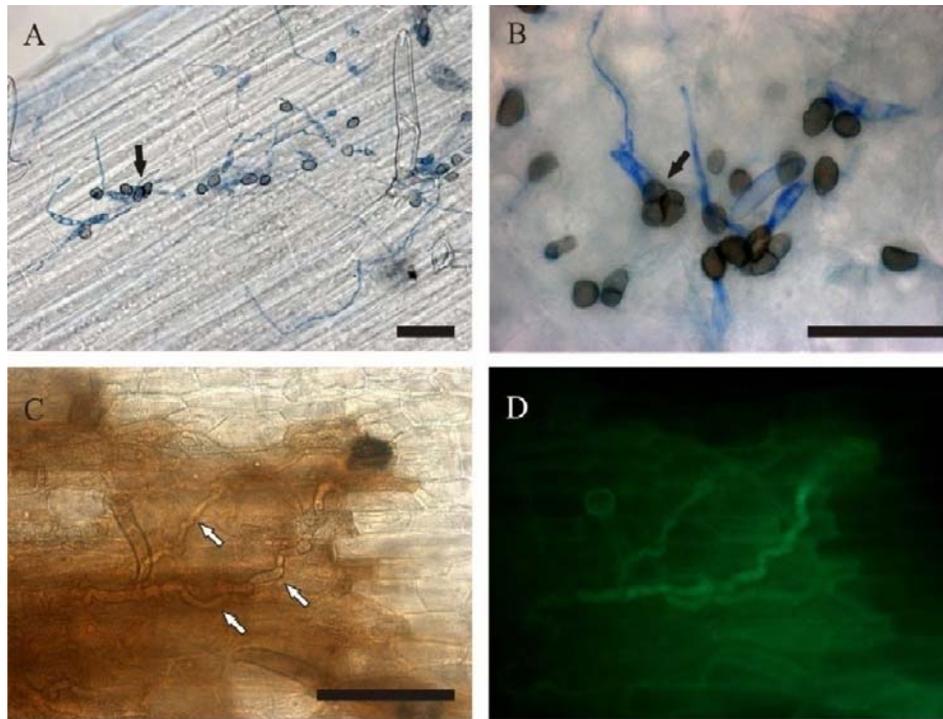
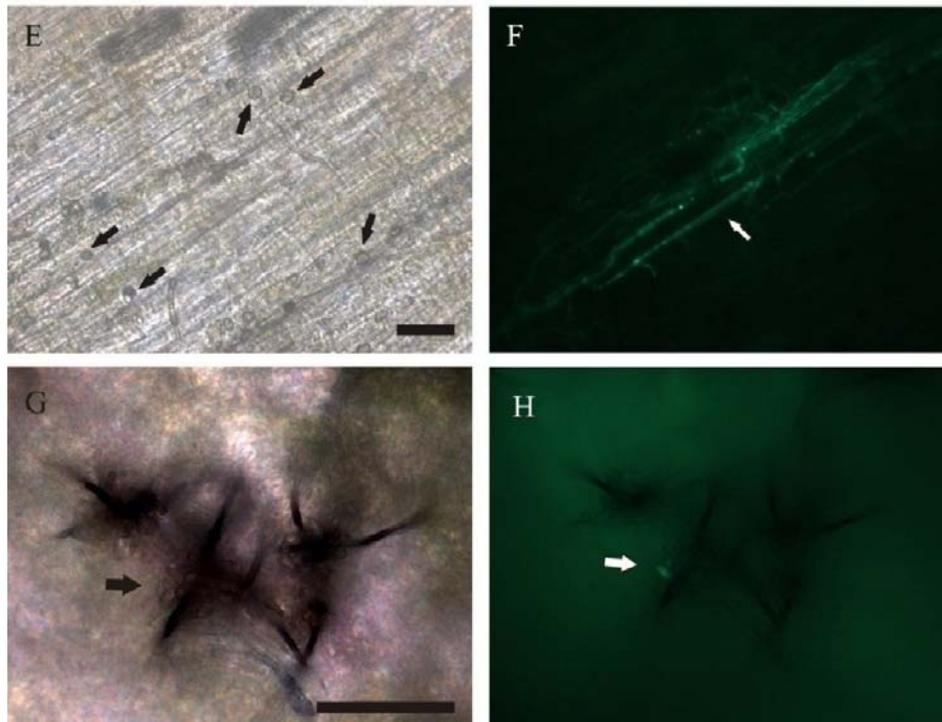


Figura 10 (A) 72 horas após a inoculação do isolado teleomórfico (UFLAG06) na cultivar suscetível com formação de hifas superficiais e apressórios (seta). (B) 72 horas após a inoculação do isolado teleomórfico (UFLAG06) na cultivar resistente, formando apressórios (seta). (C) Isolado teleomórfico transformante (tQB01) na cultivar suscetível formando hifas primárias (setas brancas), 48 horas após a inoculação. (D) Mesma imagem por microscopia de fluorescência, hifas do isolado transformante expressando GFP. (E) Isolado teleomórfico transformante (tQB01) na cultivar resistente, formando apressórios (setas pretas) 48 horas após a inoculação. (F) Mesma imagem por microscopia de fluorescência, hifas do isolado transformante expressando GFP (seta branca). (G) Formação de acérvulos e esporos (seta) em folhas da cultivar suscetível após inoculação com o isolado transformante tQB01, 72 horas após a infecção. (B) Mesma imagem por microscopia de fluorescência com esporos expressando GFP (seta). Barra: 10  $\mu$ m

(...continua...)



No experimento de coinoculações foi observado o crescimento de hifas do isolado teleomórfico transformante (tQB01) sobre lesões de antracnose causadas pelo isolado selvagem (LV115). Em amostras em que o isolado anamórfico transformante (tQB02) foi inoculado, foram observadas hifas sobre lesões de antracnose e ao redor das mesmas e intensa formação de apressórios do isolado teleomórfico selvagem (UFLAG06) (Figura 11). Estes resultados sugerem que ambos os isolados podem colonizar as mesmas lesões de antracnose e, portanto, explicam porque têm sido isolados do campo com frequência a partir de lesões de antracnose. Nos controles da coinoculação, os isolados selvagens anamórfico e teleomórfico comportaram-se do mesmo modo que os transformantes, ou seja, anamórfico infectando e produzindo lesões e teleomórfico produzindo apressórios e hifas superficiais.

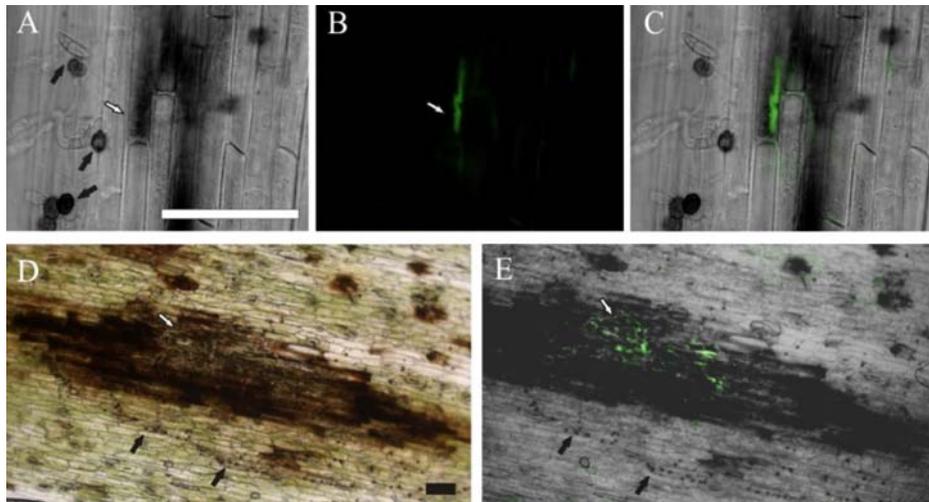


Figura 11 (A) Coinoculação na cultivar suscetível com o isolado teleomórfico transformante (tQB01) e o isolado anamórfico selvagem LV115. Observar a formação de apressórios (setas pretas) e hifa (seta branca) crescendo em lesão. (B) e (C) Mesma imagem por microscopia de fluorescência. (D) Coinoculação na cultivar suscetível do isolado anamórfico transformante (tQB02) e o isolado teleomórfico selvagem (UFLAG06). Observar a formação de hifas na lesão (seta branca) e formação de apressórios ao redor da lesão (setas pretas). (E) Mesma imagem por microscopia de fluorescência. Observar a expressão de GFP em hifas na lesão (seta branca) e apressórios (setas pretas). Imagens obtidas às 120 horas após a inoculação. Barra: 10  $\mu$ m

Desse modo, compreende-se que a interação entre os isolados teleomórficos utilizados neste estudo e o feijoeiro ocorre da seguinte forma: ao serem depositados na superfície de tecidos do feijoeiro, os ascósporos germinam rapidamente (24 horas), formando muitos apressórios melanizados e hifas superficiais. Todavia, a penetração não ocorre, a não ser que haja lesões nos tecidos, causadas por ferimentos ou por isolado anamórfico (lesões de antracnose). Adicionalmente, foi observado que o comportamento desses isolados teleomórficos não difere quando inoculados em cultivar suscetível e resistente de feijoeiro.

Os resultados deste estudo podem explicar a sintomatologia observada em testes de patogenicidade. No campo ou, até mesmo, em casa de vegetação, é possível que pequenas lesões nos tecidos causadas por insetos, por exemplo, levem à necrose e facilitem a colonização por isolados teleomórficos, causando sintomas brandos. Do mesmo modo, é possível que isolados anamórficos infectando em estágio necrotrófico e causando lesões de morte celular ofereçam oportunidade para que isolados teleomórficos colonizem as mesmas lesões, produzindo acérvulos e esporulando, sendo recuperadas ambas as fases em isolamentos.

Estruturas como conídios, tubos germinativos, apressórios, vesículas de infecção e hifas primárias têm papel importante na interação entre o patógeno e as células do hospedeiro, atuando em vários processos como adesão, sinalização celular, manutenção da viabilidade do fungo e mecanismos de reconhecimento (PERFECT; GREEN; O'CONNELL, 2001). Logo, a falta ou o não funcionamento de tais estruturas podem afetar a expressão da doença. Foi observado que os isolados teleomórficos formam apressórios melanizados, porém, esses isolados podem ter falhas na sua função, como relatado por Veneault-Fourrey et al. (2005) para *C. lindemuthianum*. Além disso, em células mortas, foram observadas hifas primárias, porém, não foram encontradas vesículas de infecção, mostrando evidências de que a falha ou a falta de afinidade desses isolados com o hospedeiro possam estar no momento da formação do peg de penetração e formação da vesícula de infecção.

A ultraestrutura de apressórios de diferentes espécies de *Colletotrichum* demonstra algumas características em comum. Normalmente, a parede do apressório tem uma ou três camadas, com melanina preferencialmente depositada dentro de uma delas (BAILEY; JEGER, 1992). Melaninas são macromoléculas formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos, apresentam coloração marrom ou preta, podendo adquirir outras

tonalidades, possuem caráter hidrofóbico e são carregadas negativamente (LANGFELDER et al., 2003).

A camada de melanina diminui a permeabilidade do apressório, aumentando a pressão de turgor interna por meio da produção e acúmulo de grandes quantidades de componentes osmoticamente ativos (DEISING; WERNER; WERNITZ, 2000; KUBO et al., 2000; MENDGEN; DEISING, 1993), como o glicerol (JONG et al., 1997). Logo, a biossíntese da melanina está relacionada com a capacidade de penetração do apressório, gerando alta pressão hidrostática requerida para a penetração direta no hospedeiro (HOWARD; VALENT, 1996).

A aderência firme do apressório é também fator essencial para que possa exercer a força mecânica requerida para a penetração, sem deslocar o fungo da superfície a ser penetrada. A formação do apressório é frequentemente acompanhada pela secreção de uma matriz mucilaginosa que o envolve. Em *C. lindemuthianum*, essa matriz estende-se para as regiões de cutícula próximas ao apressório e parece colaborar para a sua adesão (BAILEY; JEGER, 1992; O'CONNELL; BAILEY; RICHMOND, 1985). A adesão do apressório é mediada por glicoproteínas ricas em manose e galactose da matriz extracelular secretada durante a sua diferenciação (PAIN et al., 1996).

Adicionalmente, as possíveis causas para a falha desses isolados teleomórficos podem estar na secreção de enzimas hidrolíticas que se acredita serem produzidas após a diferenciação da hifa peg de penetração a partir de apressórios (PERFECT; GREEN, 2001), já que ocorrem modificações químicas nas regiões das paredes celulares próximas ao peg. Utilizando-se o gene da proteína fluorescente verde *gfp* sob controle do promotor do gene *clpg2*, foi observado que o gene que codifica endoPG (*clpg2*) é expresso nos estágios iniciais da germinação do conídio e durante a formação do apressório, tanto *in vitro* quanto na planta hospedeira (DUMAS et al., 1999).

Sabe-se que, em condições de campo, a pressão de seleção sobre as populações do patógeno é intensa e diversos mecanismos de ampliação da variabilidade genética podem ocorrer para que se aumentem as chances de sobrevivência do mesmo. Portanto, é importante observar a ocorrência desses isolados teleomórficos, do ponto de vista genético e evolutivo.

É interessante ressaltar a instabilidade fenotípica observada para os isolados utilizados neste estudo, formando setores e diversos tipos de colônias após a obtenção de monospóricas, com diferentes padrões de formação de esporos e, até mesmo, de colônias estéreis. As causas para essa instabilidade podem estar relacionadas com elementos transponíveis ativos e o polimorfismo cromossômico (ISHIKAWA; SOUZA; DAVIDE, 2003; O'SULLIVAN et al., 1998; ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003).

Além de mutações e do ciclo sexual, em fungos filamentosos pode haver outros mecanismos de transferência de material genético, como a ocorrência do ciclo parassexual (CASTRO-PRADO et al., 2007; HASTIE, 1981; ROCA, 1997) e a recombinação não meiótica via tubos de anastomoses conidiais (*conidial anastomosis tubes*, CATs) (ISHIKAWA et al., 2010; ROCA et al., 2003, 2004) que podem levar ao polimorfismo cromossômico (KISTLER; MIAO, 1992; O'SULLIVAN et al., 1998; ROCA; DAVIDE; MENDES-COSTA, 2003) e ao rearranjo do genoma (O'SULLIVAN et al., 1998).

As fusões de CATs foram também observadas neste estudo entre esporos de isolado anamórfico (Fig. 3c) e entre esporos de isolados teleomórficos (Não publicado) e tais eventos podem ter papel importante na ampliação da variabilidade genética e na patogenicidade (ISHIKAWA et al., 2010; ROCA et al., 2004).

#### **4 CONCLUSÃO**

- a) os isolados teleomórficos apresentam comportamento semelhante ao de isolados anamórficos na pré-penetração no feijoeiro, porém, com diferenças temporais no desenvolvimento das estruturas;
- b) nos eventos pós-penetração, os isolados teleomórficos não formaram vesículas de infecção e hifas primárias, exceto na presença de morte celular;
- c) o comportamento dos isolados teleomórficos foi semelhante quando inoculados nas cultivares suscetível e resistente de feijoeiro, apresentando-se não patogênicos.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, E. **Resistência do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.) à infecção causada por *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. E Magn.) Scrib. e à sua transmissão pelas sementes.** 1988. 114 f. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 1988.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. ***Colletotrichum*: biology, pathology and control.** Wallingford: CAB International, 1992. 388 p.
- BATISTA, U. G.; CHAVES, G. M. Patogenicidade de culturas monoascospóricas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7, n. 2, p. 285-293, jun. 1982.
- BRYGOO, Y. et al. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Ed.). **Molecular variability of fungal pathogens.** Wallingford: CAB International, 1998. p. 133-148.
- BRYSON, R. J. **Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*.** 1990. 272 f. Thesis (Ph.D. in Genetics of the Plants) - University of Birmingham, Birmingham, 1990.
- CAMARGO JÚNIOR, O. A. et al. Identification of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 607-615, June 2007.
- CASTRO-PRADO, M. A. A. et al. Vegetative compatibility and parasexual segregation in *Colletotrichum lindemuthianum*, a fungal pathogen of the common bean. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 6, n. 3, p. 634-642, Sept. 2007.
- CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. **Informe anual 1988: programa de Frijol.** Cali, 1990. 129 p. (Documento de Trabajo, 72).
- CHILTON, S. J. P.; LUCAS, G. B.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella* III: crosses with a conidial strain. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 32, p. 717-721, 1945.

CHILTON, S. J. P.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella* VI: linkage. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 36, p. 270-273, 1949a.

\_\_\_\_\_. Genetics of *Glomerella* VII: mutation and segregation in plus cultures. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 36, p. 717-721, 1949b.

COPPIN, E.; DEBUCHY, R.; PICARD, M. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 61, n. 4, p. 411-428, Dec. 1997.

CZYMMEK, K. J. et al. Utility of cytoplasmic fluorescent proteins for live-cell imaging of *Magnaporthe grisea* in plant. **Mycologia**, New York, v. 94, n. 2, p. 280-289, Aug. 2002.

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

DRIVER, C. H.; WHEELER, H. E. A sexual hormone in *Glomerella*. **Mycologia**, New York, v. 47, p. 311-316, 1955.

DUMAS, B. et al. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 4, p. 1769-1771, Apr. 1999.

EDGERTON, C. W.; CHILTON, S. J. P.; LUCAS, G. B. Genetics of *Glomerella* II: fertilization between strains. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 32, p. 115-118, 1945.

FLOWERS, J. L.; VAILLANCOURT, L. J. Parameters affecting the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Colletotrichum graminicola*. **Current Genetics**, New York, v. 48, n. 6, p. 380-388, Nov. 2005.

FREITAG, M. et al. GFP as a tool to analyze the organization, dynamics and function of nuclei and microtubules in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 10, p. 897-910, Oct. 2004.

GLASS, N. L.; KULDAU, G. A. Mating type and vegetative incompatibility in filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 201-224, Nov. 1992.

HABGOOD, H. Designation of physiological races of plant pathogens. **Nature**, v. 227, p. 1268-1269, 1970.

HASTIE, A. C. The genetics of conidial fungi. In: COLE, G. T.; KENDRICK, B. (Ed.). **Biology of conidial fungi**. New York: Academic, 1981. v. 2, p. 511-547.

HERBERT, C. et al. Production of a cell wall-associated endopolygalacturonase by *Colletotrichum lindemuthianum* and pectin degradation during bean infection. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 41, n. 2, p. 140-147, Feb. 2004.

HOROWITZ, S. et al. Differential protein expression in *Colletotrichum acutatum*: changes associated with reactive oxygen species and nitrogen starvation implicated in pathogenicity on strawberry. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 9, n. 2, p. 171-190, Apr. 2008.

HOROWITZ, S.; FREEMAN, S.; SHARON, A. Use of green fluorescent protein-transgenic strains to study pathogenic and nonpathogenic lifestyles in *Colletotrichum acutatum*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 92, n. 7, p. 743-749, July 2002.

HOWARD, R. J.; VALENT, B. Breaking and entering: host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. **Annual Review of Microbiology**, London, v. 50, p. 491-512, Nov. 1996.

ISHIKAWA, F. H. et al. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 2-9, Jan. 2010.

\_\_\_\_\_. Pathogenic variability of causal agent of common bean anthracnose. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, Fort Collins, v. 51, n. 3, p. 184-185, Mar. 2008.

ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A.; DAVIDE, L. M. C. Genetic variability within isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* belongin to race 65 from the state of Minas Gerais, Brazil. **Biologia**, Lahore, v. 63, n. 2, p. 156-161, Apr. 2008.

\_\_\_\_\_. Polimorfismo cromossômico do *Colletotrichum lindemuthianum* agente causal da antracnose do feijoeiro. In: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, 49., 2003, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: SBG, 2003. 1 CD-ROM.

JERBA, V. F.; RODELLA, R. A.; FURTADO, E. L. Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 217-223, mar. 2005.

JONG, J. C. B. et al. Glycerol generates turgor in rice blast. **Nature**, London, v. 389, n. 244, p. 244-245, Sept. 1997.

JUNQUEIRA, N. T. V. et al. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas da seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, MG, v. 31, n. 177, p. 322-331, set. 1984.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1997. v. 2, 690 p.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v. Scherenk. f.sp. *Phaseoli* n.f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v. 27, p. 411-437, 1970.

KISTLER, H. C.; MIAO, V. P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, Sept. 1992.

KRONSTAD, J. W.; STABEN, C. Mating type in filamentous fungi. **Annual Review Genetics**, Palo Alto, v. 31, p. 245-276, Sept. 1997.

KUBO, Y. et al. Regulation of melanin biosynthesis genes during appressorium formation by *Colletotrichum lagenarium*. In: PRUSKY, D.; REEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. Saint Paul: APS, 2000. p. 99-113.

KUMAR, V. et al. Surface ultrastructural studies on penetration and infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* on mulberry leaf causing Black spot disease. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 149, n. 11, p. 629-633, Dec. 2001.

LANGFELDER, K. et al. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 143-158, Mar. 2003.

LATUNDE-DADA, A. O. et al. Cultivar resistance to anthracnose disease of cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) caused by *Colletotrichum destructivum* O' Gara. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 105, n. 5, p. 445-451, Aug. 1999.

LATUNDE-DADA, A. O.; LUCAS, J. A. Localized hemibiotrophy in *Colletotrichum*: cytological and molecular taxonomic similarities among *C. destructivum*, *C. linicola* and *C. truncatum*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 56, n. 3, p. 437-447, June 2007.

LORANG, J. M. et al. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 67, n. 5, p. 1987-1994, May 2001.

LUCAS, G. B. Genetics of *Glomerella* IV: nuclear phenomena in the ascus. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 33, p. 802-806, 1946.

LUCAS, G. B.; CHILTON, S. J. P.; EDGERTON, C. W. Genetics of *Glomerella* I: studies on the behaviour of certain strains. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 31, p. 233-239, 1944.

LUNA-MARTINEZ, F. et al. Development of a molecular genetic linkage map for *Colletotrichum lindemuthianum* and segregation analysis of two avirulence genes. **Current Genetics**, London, v. 51, n. 2, p. 109-121, Feb. 2007.

MACHADO, J. C. Padrões de tolerancia a patógenos associados à semente. In: \_\_\_\_\_. **Revisão anual de patologia de plantas 2**. Passo Fundo: Pe. Berthier, 1994. p. 229-263.

MAHUKU, G. S.; RIASCOS, J. J. Virulence and molecular diversity within *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from Andean and Mesoamerican bean varieties and regions. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, n. 3, p. 253-263, Mar. 2004.

MCDONALD, B. A.; LINDE, C. The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. **Euphytica**, Wageningen, v. 124, n. 2, p. 163-180, Mar. 2002.

MCGAHEN, J. W.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella* IX: perithecial development and plasmogamy. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 38, p. 610-617, 1951.

MEINHARDT, F.; ESSER, K. Sex determination and sexual differentiation in filamentous fungi. **Critical Review in Plant Science**, Boca Raton, v. 9, n. 4, p. 329-341, Dec. 1990.

MENDES-COSTA, M. C. Genetics of *Glomerella cingulata* f sp. *Phaseoli* I: sexual compatibility. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v. 19, n. 3, p. 350-351, maio/jun. 1996.

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

METZENBERG, R. L.; GLAS, N. L. Mating type and mating strategies in *Neurospora*. **BioEssays**, Cambridge, v. 12, n. 2, p. 53-59, Feb. 1990.

MONEY, N. P.; HOWARD, R. J. Confirmation of a link between fungal pigmentation, turgor pressure, and pathogenicity using a new method of turgor measurement. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 20, n. 3, p. 217-227, Sept. 1996.

O'CONNELL, R. J. Absence of a specialized interface between infection hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* and *Phaseolus vulgaris*. **New Phytologist**, Cambridge, v. 107, n. 2, p. 725-734, Feb. 1987.

O'CONNELL, R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D. V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiology Plant Pathology**, London, v. 27, n. 1, p. 75-98, July 1985.

O'CONNELL, R. J. et al. Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection processes. In: PRUSKY, D.; REEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. Saint Paul: APS, 2000. p. 57-77.

\_\_\_\_\_. Ultrastructure and composition of the cell surfaces of infection structures formed by the fungal plant pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Journal of Microscopy**, New York, v. 181, n. 4, p. 204-212, Apr. 1996.

O'SULLIVAN, D. T. et al. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, London, v. 33, n. 4, p. 291-298, Apr. 1998.

PAIN, N. A. et al. Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and apressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Protoplasma**, New York, v. 190, n. 5, p. 119-139, May 1996.

\_\_\_\_\_. Identification of glycoproteins specific to biotrophic intracellular hyphae formed in the *Colletotrichum lindemuthianum*-bean interaction. **New Phytopathology**, Cambridge, v. 127, n. 2, p. 233-242, June 1994.

PARK, G. et al. Independent genetic mechanisms mediate turgor generation and penetration peg formation during plant infection in the rice blast fungus. **Molecular Microbiology**, Salem, v. 53, n. 6, p. 1695-1707, Dec. 2004.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R. Infection structures of biotrophic and hemibiotrophic fungal plant pathogens. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 2, n. 2, p. 101-108, Apr. 2001.

PERFECT, S. E.; GREEN, J. R.; O'CONNELL, R. J. Surface characteristics of necrotrophic secondary hyphae produced by the bean antracnose fungus, *Colletotrichum lindemuthianum*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 107, n. 8, p. 813-819, Oct. 2001.

PRIA, M. D. et al. Diagnose das doenças. In: CANTERI, M. G.; PRIA, M. D.; SILVA, O. C. (Ed.). **Principais doenças fúngicas do feijoeiro**: orientações para manejo econômico e ecológico. Ponta Grossa: UEPG, 1999. p. 17-34.

RECH, C.; ENGH, I.; KÜCK, U. Detection of hyphal fusion in filamentous fungi using differently fluorescence-labeled histones. **Current Genetics Lower Euckaryotes and Organelles**, Heidelberg, v. 52, n. 6, p. 259-266, Nov. 2007.

ROCA, M. G. **Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck. f.sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner)**. 1997. 82 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1997.

ROCA, M. G.; DAVIDE, L. C.; MENDES-COSTA, M. C. Citogenética de *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 367-373, jul. 2003.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomosis fusion between *Colletotrichum* spp. **Mycology Research**, Cambridge, v. 108, n. 11, p. 1320-1326, Nov. 2004.

\_\_\_\_\_. Conidial anastomosis tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics Biology**, Orlando, v. 40, n. 2, p. 138-145, Nov. 2003.

RODRIGUEZ-GUERRA, R. et al. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 4, p. 793-803, May 2005.

RYAN, C. C.; CLARE, B. G. Coating of leaf surfaces white agarose to reaction fungal inoculum in situ staining. **Stain Technology**, Baltimore, v. 49, p. 15-18, 1974.

SCHOONHOVEN, A. V.; PASTOR-CORRALES, M. A. **Standard system for the evaluation of bean germoplasma**. Cali: Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1987. 27 p.

SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, Washington, v. 30, n. 3, p. 507-512, Sept. 1974.

SHEAR, C. L.; WOOD, A. K. **Studies of fungus parasites belonging to the genus *Glomerella***. Washington: USDA Bureau of Plant Industry, 1913. 110 p. (Bulletin, 252).

SILVA, K. J. D. e; SOUZA, E. A.; ISHIKAWA, F. H. Characterization of *Colletotrichum lindemuthianum* isolates from the state of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 155, n. 4, p. 241-247, Apr. 2007.

SOUZA, B. O.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determination of variability in isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* based on morphological and cultural markers. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, jul./ago. 2007.

SOUZA, E. A.; CAMARGO JÚNIOR, O. P. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, June 2010.

SUGUI, J. A.; DEISING, H. B. Isolation of infection-specific sequence tags expressed during early stages of maize antracnose disease development. **Molecular Plant Pathology**, London, v. 3, n. 4, p. 197-203, Aug. 2002.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

VAILLANCOURT, L.; WANG, J.; HANAU, R. Genetic regulation of sexual compatibility in *Glomerella graminicola*. In: PRUSKY, D.; REEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). ***Colletotrichum*: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**. Saint Paul: APS, 2000. p. 29-44.

VENARD, C.; VAILLANCOURT, L. Colonization of fiber cells by *Colletotrichum graminicola* in wounded maize stalks. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 97, n. 4, p. 438-447, Apr. 2007.

VERNAULT-FOURREY, C. et al. The tetraspanin gene CIPLS1 is essential for appressorium-mediated penetration of the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Genetics Biology**, Orlando, v. 42, n. 4, p. 306-318, Apr. 2005.

VERNAULT-FOURREY, C.; LAUGÉ, R.; LANGIN, T. Nonpathogenic Strains of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger progressive bean defense responses during appressorium-mediated penetration. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71, n. 8, p. 4761-4770, Aug. 2005.

VIEIRA, C. **Doenças e pragas do feijoeiro**. Viçosa, MG: UFV, 1983. 231 p.

WALKER, J. C. **Enfermedades de las hortalizas**. Barcelona: Salvat, 1959. 624 p.

WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella* VIII: a genetic basis for the occurrence of minus mutants. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 37, p. 304-312, 1950.

\_\_\_\_\_. Linkage groups in *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 43, p. 1-6, 1956.

WHEELER, H. E.; DRIVER, C. H.; CAMPA, C. Cross- and self-fertilization in *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 46, p. 361-365, 1959.

WHEELER, H. E. et al. Genetics of *glomerella* V: crozier and ascus development. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 35, p. 722-728, 1948.

WIJESUNDERA, R. L. C.; BAILEY, J. A.; BYRDE, R. J. W. Production of pectin lyase by *Colletotrichum lindemuthianum* in culture and in infected bean (*Phaseolus vulgaris*) tissue. **Journal of General Microbiology**, London, v. 130, n. 1, p. 285-290, Oct. 1984.