

JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES

**HISTOLOGIA DA INTERAÇÃO *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque  
EM GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2000

JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES

**HISTOLOGIA DA INTERAÇÃO *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque  
EM GUARANAZEIRO (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de “Magister Scientiae”.

APROVADA: 9 de agosto de 1999.

---

Prof. Luiz Antônio Maffia  
(Conselheiro)

---

Prof. Robert Weingart Barreto  
(Conselheiro)

---

Prof. Ulisses Gomes Batista

---

Prof. Murilo Geraldo de Carvalho

---

Prof. Kiyoshi Matsuoka  
(Orientador)

A Deus, por todas as graças concebidas.  
Aos meus pais, Linhares e Lindalva.  
Aos meus irmãos, James e Júnior.  
Ao meu esposo, Hedinaldo,  
pelo estímulo em todos os momentos .

## **AGRADECIMENTO**

Ao professor Kiyoshi Matsuoka, por todos os ensinamentos.

Aos professores, Luis Antônio Maffia, Robert Barreto, Ulisses Gomes Batista e Murilo de Carvalho e ao Dr. Luadir Gasparotto, pelas sugestões e pelo apoio.

Aos funcionários da Embrapa-Amazônia Ocidental, D. Néa, Ricardo e Seabra, pelo apoio e agradável convívio.

Aos colegas, Pierce, Antônio, Reginaldo, Riva e Cláudia Vanetti, pelo auxílio nas horas difíceis e pelos bons momentos.

A amiga Adelica, pela amizade dedicada e pelo apoio constante.

A todos os professores do Departamento de Fitopatologia, pelos ensinamentos valiosos.

Aos funcionários do Departamento de Fitopatologia, pela colaboração.

A Embrapa-Amazônia Ocidental, pelo apoio financeiro e fornecimento de suas instalações para realização de parte deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a esta pesquisa.

## **BIOGRAFIA**

JÂNIA LÍLIA DA SILVA BENTES, filha de Jeú Linhares Bentes e Lindalva da Silva Bentes, nasceu em 8 de janeiro de 1971, em Manaus, Estado do Amazonas.

Em janeiro de 1997, graduou-se em Agronomia, pela Universidade Federal do Amazonas, em Manaus.

Em março de 1997, iniciou o curso de Mestrado em Fitopatologia, na Universidade Federal de Viçosa.

## CONTEÚDO

	<b>Página</b>
LISTA DE QUADROS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
EXTRATO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	10
3.1. Reavaliação da identidade do agente causal da antracnose do guaranazeiro .....	10
3.2. Obtenção e seleção dos clones e isolados .....	11
3.3. Inoculação de clones resistente e suscetível .....	11
3.3.1. Preparo do inóculo .....	12
3.3.2. Inoculação e coleta das amostras .....	12
3.4. Quantificação dos eventos de pré-penetração em folhas novas e velhas clareadas de clone resistente e suscetível .....	13
3.5. Observação da colonização dos tecidos .....	13
3.6. Microscopia eletrônica e varredura .....	14

	<b>Página</b>
4. RESULTADOS .....	15
4.1. Reavaliação da identidade do agente causal da antracnose do guaranazeiro .....	15
4.2. Seleção de clones e isolado .....	17
4.3. Avaliação dos eventos de pré-penetração em clones resistente e suscetível .....	18
4.3.1. Germinação .....	18
4.3.2. Formação de apressórios .....	18
4.4. Avaliação dos eventos de pré-penetração em folhas novas e velhas dos clones resistente e suscetível .....	20
4.4.1. Germinação .....	20
4.4.2. Formação de apressório .....	20
4.5. Processo de infecção e colonização dos tecidos .....	20
4.5.1. Pré-penetração .....	20
4.5.2. Penetração .....	23
4.5.3. Colonização dos tecidos .....	23
4.6. Penetração e colonização de tecidos em clone suscetível .....	27
4.7. Penetração e colonização de tecidos em clone resistente .....	27
5. DISCUSSÃO .....	30
6. RESUMO E CONCLUSÕES .....	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
APÊNDICE .....	47

## LISTA DE QUADROS

	<b>Página</b>
1 Diâmetro de lesões causadas por isolados de <i>C. guaranicola</i> em diferentes clones de guaranazeiro .....	17
2 Espécies do gênero <i>Colletotrichum</i> com conídios cilíndricos .....	31
1A Porcentagem de germinação de conídios em clones resistente e suscetível e em folhas novas e velhas, no período de 6 a 48 horas após a inoculação (h.a.i.) .....	48
2A Porcentagem de formação e apressório melanizado em clones resistentes e suscetível e em folhas novas e velhas, no período de 6 a 48 horas após a inoculação (h.a.i.) .....	48

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
1 Conídios de <i>C. guaranicola</i> , apresentando variação de tamanho e forma (Barra = 10 $\mu\text{m}$ ) .....	16
2 Apressórios de <i>C. guaranicola</i> , com formas e tamanhos variados (Barra = 5,5 $\mu\text{m}$ ) .....	16
3 Germinação de conídios em clones de guaranazeiro resistente e suscetível à <i>C. guaranicola</i> (as barras nas colunas representam o desvio-padrão médio) .....	19
4 Formação de apressório em clones de guaranazeiro resistente e suscetível a <i>C. guaranicola</i> (as barras nas colunas representam o desvio-padrão médio) .....	19
5 Germinação de conídios em folha nova de clones resistente e suscetível a <i>C. guaranicola</i> .....	21
6 Germinação de conídios em folha velha de clones resistente e suscetível a <i>C. guaranicola</i> .....	21
7 Formação de apressório em folhas novas em clones resistente e suscetível a <i>C. guaranicola</i> .....	22
8 Formação de apressório em folhas velhas de clones resistente e suscetível a <i>C. guaranicola</i> .....	22

- 9 Microscopia eletrônica de varredura. A) Cicatriz deixada pelo conídio (seta) e apressório. B) Apressório aderido à superfície do hospedeiro. Não foi possível diferenciar a natureza do material aderido ao tubo germinativo e apressório (setas), possivelmente trata-se de substância adesiva ou cutícula do hospedeiro (Barra em A e B = 5  $\mu\text{m}$ ) ..... 24
- 10 Processo de infecção de *C. guaranicola* em guaranazeiro. A) Conídio germinado com apressório na superfície do hospedeiro. B) Apressório com cone apressorial (seta). C) Hifa de infecção penetrando (seta). D) Hifa primária em célula epidérmica. E) Hifa ramificando em célula epidérmica. F e G) Colonização de células epidérmicas e do parênquima (setas). H) Tecido colonizado e necrosado (Barras em A, B, C, D, E, F = 10  $\mu\text{m}$ , em G e H = 25  $\mu\text{m}$ ) ..... 25
- 11 Formação de papila (seta) em material resistente (A e B) restringindo a penetração, e suscetível (C) aparentemente a hifa de infecção atravessa a papila (Barra = 10  $\mu\text{m}$ ) ..... 26
- 12 Processo de infecção no clone suscetível. A) Penetração e apressório com cone apressorial (seta), 24 h.a.i. B) Vesícula de infecção (seta) e hifa primária, 24 h.a.i. C) Ramificação de hifa, 24 h.a.i. D) Hifa em célula epidérmica, 24 h.a.i. E) Colonização de células do parênquima (seta), 48 h.a.i. F) Colonização de tecidos (seta), sem necrose, 96 h.a.i. G) Tecido colonizado e necrosado (seta), 120 h.a.i. (Barras em A, B, C, D = 10  $\mu\text{m}$ , em E, F, G = 25  $\mu\text{m}$ ) ..... 28
- 13 Processo de infecção e colonização em clone resistente. A) Apressório com cone apressorial (seta), sem hifa de infecção, 24 h.a.i. B) Hifa primária, 48 h.a.i. C) Hifa em célula epidérmica (seta), 72 h.a.i. D e E) Hifa intracelular em células do parênquima, 96 h.a.i. F) Colonização de todas as camadas de células (setas), 120 h.a.i. G) Tecido colonizado com necrose, 168 h.a.i. (Barras em A, B, C, D e E = 10  $\mu\text{m}$ , em F e G = 25  $\mu\text{m}$ ) ..... 29

## EXTRATO

BENTES, Jânia Lília da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2000. **Histologia da interação *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque em guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. Orientador: Kiyoshi Matsuoka. Conselheiros: Luadir Gasparotto, Luíz Antônio Maffia e Robert Weingart Barreto.

Foi realizada uma reavaliação do agente causal da antracnose do guaranazeiro e estudado o processo de infecção do fungo em clones resistente e suscetível. Avaliaram-se, quantitativamente, os eventos de pré-penetração em folhas novas e velhas dos clones. A identidade do agente causal da doença foi confirmada como *Colletotrichum guaranicola*, após a reavaliação morfológica de conídios e apressórios, e comparação dos dados obtidos com os de outras espécies deste gênero, descritas na literatura. Quanto aos eventos de pré-penetração, observou-se que há diferença quantitativa quanto à formação de apressório em folhas novas, velhas e entre os clones. Tanto a germinação quanto a formação de apressório é maior em folhas novas do clone suscetível. No clone resistente, não foram observadas diferenças quanto à germinação entre folha nova e velha. A formação e apressório são maior em folhas novas neste clone. O processo de infecção tem início após o fungo germinar na superfície do

hospedeiro e formar um apressório que emite uma hifa de infecção. Esta hifa de infecção penetra diretamente a cutícula e a parede celular das células epidérmicas. Dentro da célula, a hifa de infecção dá origem a uma vesícula, que em seguida forma a hifa primária na célula inicialmente infectada. A hifa primária se ramifica, originando a hifa secundária, que coloniza intra e intercelularmente a epiderme e o parênquima, causando a desorganização dos tecidos e necrose. Observou-se uma diferença temporal na colonização dos tecidos dos clones. No clone suscetível, com 48 horas após a inoculação, as células da epiderme e do parênquima estavam colonizadas por hifas intra e intercelulares. No quinto dia após a inoculação, observou-se o surgimento dos sintomas. No clone resistente, a colonização só foi observada no quarto dia após a inoculação. Somente no sétimo dia após a inoculação, foram observados os primeiros sintomas típicos da doença.

## ABSTRACT

BENTES, Jânia Lília da Silva, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February 2000. **Histology of *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque on guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*)**. Adviser: Kiyoshi Matsuoka. Committee members: Luadir Gasparotto, Luís Antônio Maffia and Robert Weingart Barreto.

A morphological study of conidia and appressoria of the anthracosis fungus of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) has confirmed the pathogen identity as *Colletotrichum guaranicola*. The pre-penetration events of conidia germination and appressoria production differed quantitatively on new and old leaves, on susceptible and resistant clones, since they were more frequent in the former than in the latter ones. But no difference was found in the frequency of conidia germination on new and old leaves of resistant clones. Temporal quantitative differences were observed in the appressorium formation on susceptible and resistant leaf surfaces. Thus, more appressoria were found on susceptible than on resistant leaves 24 hours after inoculation. Processes and fungal structures were the same on susceptible and resistant guarana leaves: direct penetration by means of melanized appressoria, with infection hyphae and vesicles present in the epidermal cells; development of primary and secondary hyphae; inter and intra cellular colonization of the parenchyma. However,

eventes, such as parenchyma colonization and onset of leaf symptoms, took 48-hour longer to unfold in resistant leaves than un susceptible leaves.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil é praticamente o único produtor de guaraná (*Paulinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke), em escala comercial, no mundo (GUARANÁ, 1985). Segundo estimativas, em 1985, as plantações de guaraná ocupavam aproximadamente 12.000 ha dos quais 9.000 ha encontravam-se no município de Maués no estado do Amazonas (GUARANÁ, 1985; DUARTE et al., 1995). Apesar da baixa produtividade, quando comparada à de outras culturas, o guaraná é de grande valor para a economia regional, pois alcança bons preços na comercialização e constitui-se numa alternativa para diversificação da agricultura.

Um fator que limita a produção e a expansão da guaranicultura no Amazonas é a antracnose, considerada a doença mais séria da cultura pois causa danos significativos às plantas e prejuízos consideráveis aos produtores. Visando o controle mais eficiente desta doença, alguns pesquisadores têm recomendado o uso de clones resistentes.

O agente causal da doença, o fungo *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque, foi descrito por ALBUQUERQUE (1961). Entretanto, a identidade desta espécie de *Colletotrichum* ainda não é reconhecida pela revisão mais recente do gênero (SUTTON, 1992). Dessa forma, torna-se necessário uma reavaliação deste táxon para que sua identidade seja esclarecida.

As estratégias de infecção dos fungos fitopatogênicos envolvem alguns estádios como: fixação e germinação dos propágulos; diferenciação em estruturas especializadas de pré-penetração (apressório por exemplo); penetração nas células do hospedeiro; desenvolvimento de hifa de infecção e colonização dos tecidos da planta (BAILEY et al., 1992). Em alguns destes estádios, diferenciações induzidas ou próprias, na morfologia, bioquímica ou fisiologia das plantas podem ter grande repercussão no estabelecimento de interações compatíveis com o patógeno e conseqüentemente na expressão dos sintomas da doença (MORIN et al., 1996).

Através de estudos histopatológicos e de técnicas de microscopia eletrônica, podem-se conhecer detalhes das relações patógeno-hospedeiro e as alterações decorrentes desta interação, tornando possível observar algumas mudanças nas células e comparar o comportamento de hospedeiros suscetíveis e resistentes. Os dados assim obtidos podem fornecer subsídios para estudos citoquímicos e imunoquímicos, que contribuem bastante para a elucidação dos mecanismos de resistência. Estas informações são de grande utilidade na orientação de programas de melhoramento genético e controle da doença, resultando em elevação dos níveis de produtividade das culturas.

Estudos relacionados com a interação *Colletotrichum* spp-hospedeiros são bastante comuns, mas pouco se sabe sobre o patossistema *Colletotrichum* sp. e guaranazeiro. O trabalho de ALBUQUERQUE (1961) foi o único encontrado que relata alguns aspectos referentes a essa interação. Diante da necessidade de mais informações sobre a interação *Colletotrichum* sp.- guaranazeiro, este trabalho tem por objetivos:

a) reavaliar a posição taxonômica do agente causal da antracnose do guaranazeiro;

b) estudar o processo de infecção, no patossistema *Colletotrichum*. sp. x *P. cupana* var. *sorbilis*, e observar as modificações morfológicas e citológicas decorrentes desta interação em clones de guaranazeiro resistente e suscetível à antracnose; e

c) quantificar os eventos de pré-penetração, comparando os dois genótipos em estudo.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

O guaranazeiro (*Paullinia cupana*) é uma espécie vegetal nativa da Amazônia, cujo nome provém do vocábulo indígena “uaranã” que significa árvore que se apóia em outra. É encontrado em estado nativo na região compreendida entre os rios Amazonas, Madeira, Maués e Paraná do Ramos, no rio Negro e na bacia superior do Orenoco (GUARANÁ,1985).

O Brasil é praticamente o único produtor mundial de guaraná, com exceção de pequenas áreas da Amazônia venezuelana onde não existe cultivo sistemático (GUARANÁ, 1985). A principal área produtora é o município de Maués, no Amazonas, que em 1985 apresentava cerca de 9.000 ha de área plantada (GUARANÁ, 1985; DUARTE et al., 1995). Os municípios de Parintins, Urucurituba, Barreirinha, Itacoatiara, Borba e Manacapuru também contribuem para a produção de guaraná (GUARANÁ,1985). Segundo DUARTE et al. (1995), o guaranazeiro também é cultivado no Pará e em menor escala nos estados de Rondônia, Acre, Bahia e Mato Grosso.

As sementes possuem um dos mais altos teores de cafeína, variando de 0,6 a 6,2%, além da presença de teofilina e teobromina (NASCIMENTO FILHO et al., 1990). Estes três componentes, segundo Ritchie et al. (1965) citados por NASCIMENTO FILHO et al., 1990), atuam sobre o sistema cardiovascular, sistema nervoso central, músculos lisos, esqueléticos e rins. Devido a suas

inúmeras características medicinais, principalmente em virtude do seu alto teor de cafeína, e com a regulamentação da “Lei dos Sucos” de 14 de novembro de 1972 (que define uma relação insumo/produto de 300g de amêndoa por 100 litros de refrigerante), o guaraná inclui-se entre as muitas espécies vegetais que poderão contribuir para o desenvolvimento da economia amazônica (GUARANÁ, 1985; BATISTA, 1983). Porém, a produção de guaraná é baixa e não atende à demanda interna e externa, devido a diversos fatores como a falta de tecnologia adequada para o cultivo e problemas fitossanitários (BATISTA, 1983).

Até 1941, não se conheciam doenças que afetavam o guaranazeiro (SCHMIDT, 1941). Em 1961, ALBUQUERQUE relatou a ocorrência de antracnose em plantas de guaraná, isolou o agente causal da doença e o identificou como *C. guaranicola*. No entanto, a aceitação desta nova espécie ainda é questionada, sendo que na literatura especializada neste gênero, como SUTTON (1980) e SUTTON (1992) não se encontra nenhuma referência à mesma.

Segundo CORRÊA et al. (1979), BATISTA (1983), a antracnose é a doença mais importante do guaranazeiro e causa perdas significativas, por vezes torna a cultura antieconômica, sendo assim um dos fatores limitantes à expansão e produtividade dos guaranazais.

As plantas podem ser atacadas em qualquer estágio do seu desenvolvimento. Os sintomas característicos da doença são: lesões necróticas nas folhas, de coloração marrom-avermelhada, desenvolvendo-se com maior predominância nos bordos, observa-se um crestamento da margem foliar e, em casos severos, o secamento total da folha. Nas folhas mais jovens é comum ocorrerem deformações e enrolamento da lâmina foliar. A doença pode ainda causar a morte de ramos e atacar inflorescências, comprometendo o desenvolvimento da planta e reduzindo drasticamente a produção (GONÇALVES, 1968; BATISTA, 1983; EMATER/EMBRAPA, 1983; EMBRAPA, 1986; FUNDAÇÃO JOAQUIM NABUCO, 1984). Segundo BATISTA (1983), a incidência da doença é maior no período chuvoso.

Como medidas de controle, são recomendadas práticas culturais (inspeções dos guaranazais, limpeza da área de cultivo, poda de limpeza, eliminação de galhos e folhas secas ou doentes), controle químico (pulverizações com Benomyl e, ou, Tiofanato Metílico) e plantio de material resistente (BATISTA,1983; EMATER/EMBRAPA, 1983).

Em geral, nas lesões causadas por *Colletotrichum* spp. forma-se um acérvulo nas camadas mais externas do tecido do hospedeiro, de onde saem massas de conídios unidos por uma matriz mucilaginosa composta de glicoproteínas, polissacarídeos, enzimas e outros constituintes. Esta mucilagem impede a germinação prematura e dessecação dos conídios, e os protege dos raios UV e dos efeitos tóxicos de compostos fenólicos produzidos pelo hospedeiro (BAILEY et al., 1992; SKIPP et al., 1995).

Os conídios de *Colletotrichum* spp. germinam na presença de água e dão origem a um tubo germinativo e apressório que adere fortemente à cutícula do hospedeiro e geralmente está envolvido na penetração de tecidos cuticularizados (BAILEY et al., 1992). A grande complexidade da parede do apressório, quando comparada à parede do conídio ou da hifa, resulta da incorporação de melanina e outros materiais. Esta melanização é considerada como um requisito para a patogênese (SKIPP et al., 1995). Segundo KUBO e FURUSAWA (1991), a formação do apressório de *Colletotrichum* spp. é acompanhada de mudanças metabólicas essenciais à penetração, como a melanização apressorial (*C. lagenarum* e *C. lindemuthianum*), síntese de celulase (*C. lagenarium*) e síntese de cutinase (*C. gloeosporioides*).

Os conídios de muitas espécies de *Colletotrichum* podem formar apressório maduro e iniciar a penetração 9 a 72 horas após a inoculação. No entanto, sob condições desfavoráveis, a penetração pode não ocorrer imediatamente e o fungo pode entrar em quiescência (SKIPP et al., 1995). O conídio de *C. guaranicola*, tendo germinado na epiderme foliar, forma um apressório ovóide e escuro, que adere à camada mais externa da folha e emite um delgado tubo que atravessa a cutícula e penetra nas células da epiderme ou passa

por entre as paredes destas células ALBUQUERQUE (1961). A germinação dos conídios em meio de cultura ágar-água e BDA (batata dextrose ágar) se inicia 1 a 2 horas após a semeadura e prolonga-se por até 48 horas, quando atinge o percentual máximo ALBUQUERQUE (1961) e DUARTE et al. (1995). O micélio de *C. guaranicola* é intra e intercelular, hialino e septado, e não forma haustório no interior da célula vegetal suscetível (ALBUQUERQUE, 1961). O fungo forma acérvulos logo abaixo da cutícula, dos quais surgem conidióforos curtos, simples, hialinos e não septados. Os conídios são oblongos, hialinos e unicelulares (ALBUQUERQUE, 1961), adquirindo um septo, quando fisiologicamente maduros, já próximos da germinação VÉRAS (1996).

Em estudos sobre o processo inicial de infecção de *C. gloeosporioides* em frutos de abacate, COATES et al., (1993) observaram que a maioria dos conídios presentes na superfície dos frutos germinou 48 horas após a inoculação. Nos conídios era visível um septo, em alguns casos um tubo germinativo era produzido em cada célula, e raramente encontraram apressórios a partir de ambos os tubos germinativos do conídio. Os apressórios examinados apresentavam parede grossa e escura com um poro germinativo. Ocasionalmente observam-se apressórios hialinos. Os “pegs” de infecção eram curtos e finos, podendo ou não apresentar melanina, dependendo do estágio de desenvolvimento do fruto inoculado. Observou-se a presença de pegs em frutos verdes. Segundo COATES et al., (1993), o apressório formado em frutos verdes representa a fase latente do fungo. A hifa primária originou-se do “peg” de infecção. A colonização foi inter e intracelular, com rápida degradação das células da epiderme e dos tecidos internos.

MORIN et al. (1996) avaliaram a infecção de *C. gloeosporioides* f. sp. *malvae* em plantas da família Malvaceae, e observaram que os conídios começam a germinar 3 a 4 horas após a inoculação, produzindo um único tubo germinativo. Os apressórios melanizados surgiram 5 a 6 horas após a inoculação e alguns “pegs” de penetração foram produzidos. Observou-se o primeiro sinal de penetração 31 a 36 horas após a inoculação, constituído por algumas vesículas de

infecção na célula epidérmica. Com 46 a 48 horas, observaram as hifas primárias e, 72 horas após a inoculação, a hifa expandiu-se e penetrou nas células da epiderme e do mesófilo. A colonização intra e intercelular ocorreu com o desenvolvimento da hifa secundária .

*Colletotrichum* spp. podem penetrar no hospedeiro por meio de aberturas naturais (estômatos), ferimentos ou diretamente pela cutícula, sendo que esta última via é a mais comum BAILEY et al. (1992). Os mecanismos de penetração direta têm sido discutidos por vários anos, e três estratégias foram propostas: uma, baseada somente em força mecânica; outra, na secreção de enzimas degradadoras da cutina e uma terceira sendo a combinação das duas primeiras (BAILEY et al., 1992).

As plantas podem apresentar mecanismos que impedem a penetração ou colonização de seus tecidos por espécies de *Colletotrichum*. Dentre estes, ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al. (1992) e SKIPP et al. (1995) citam a resistência raça específica, manifestada em certos cultivares, após a penetração pelo patógeno. Este tipo de resistência depende da presença de um ou mais genes complementares do patógeno e do hospedeiro, com reconhecimento de eventos específicos na célula infectada. Um dos eventos que indicam o reconhecimento de uma interação incompatível é a morte rápida das células no sítio de infecção, chamado de reação de hipersensibilidade, seguido pela limitação das lesões, como ocorre na interação entre *C. lindemuthianum* e *Phaseolus vulgaris* e *Vigna unguiculata*, resultando na restrição do patógeno às células mortas, não permitindo, assim, a colonização dos tecidos do hospedeiro (SKIPP et al., 1995).

Há alguns mecanismos, os quais separadamente ou em conjunto, auxiliam a planta a resistir à penetração por *Colletotrichum* spp. conforme SKIPP et al., (1995). Tais mecanismos são conhecidos como: a) **resistência passiva**, resulta da força mecânica da cutícula e da parede das células epidérmicas, e da resistência dos seus polímeros à degradação enzimática; b) **respostas induzidas na parede celular**, como a lignificação da parede celular epidérmica, impedindo a penetração pelo aumento da força física e resistência à degradação da parede das

células; c) **deposição de papila**, são depósitos de substâncias densas, amorfas e algumas vezes coloridas, encontradas entre a membrana plasmática e a camada externa da parede das células epidérmicas, no sítio de possível penetração (SKIPP et al., 1995).

As plantas podem ainda dispor de outros mecanismos como a síntese de fitoalexinas, que são metabólitos secundários com atividade anti-microbiana e que se acumulam nas células em resposta à infecção ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al. (1992). Estudos têm sugerido que as fitoalexinas phaseolina, phaseolidina e quievitona, produzidas pelo feijoeiro, possuem papel fundamental na inibição do crescimento de *C. lindemunthianum* (SKIPP et al., 1995).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Os ensaios descritos nos itens 3.2. e 3.3. foram conduzidos no centro experimental da Embrapa Amazônia Ocidental, em Manaus-AM. Os outros ensaios deste trabalho (itens 3.1., 3.4., 3.5. e 3.6.) foram realizados no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Viçosa.

#### **3.1. Reavaliação da identidade do agente causal da antracnose do guaranazeiro**

Foram reexaminadas as características morfológicas de estruturas reprodutivas e de infecção do fungo em estudo, sob microscópio de luz. Foi utilizada uma ocular micrométrica nas mensurações. Foram medidos 200 conídios e 200 apressórios do isolado ISO 1, selecionado como descrito no item 3.2. Aspectos relevantes da morfologia foram ilustrados, usando-se uma câmara clara. A colônia do fungo, assim como a formação de acérvulos e setas também foram examinados.

### **3.2. Obtenção e seleção dos clones e isolados**

Sete clones de guaranazeiro, designados 224, 368, 514, 619, 620, 626 e 628, apresentando diferentes níveis de resistência, de acordo com a seleção feita pelos pesquisadores da Embrapa Amazônia Ocidental, foram inoculados com três isolados de *C. guaranicola*, obtidos de plantas infectadas, de três distintas regiões produtoras de guaraná (iso 1- Itacoatiara-AM, iso 2- Manaus-AM e iso F- Mato Grosso-MT). A inoculação foi feita em mudas, na casa de vegetação, usando-se discos de cultura com 10 dias de idade e com 5 mm de diâmetro, contendo micélio e conídios. Foram usados três discos por folha, depositados em ferimentos, feitos com agulha sem atravessar o tecido foliar, na face adaxial das três últimas folhas do ramo principal, enumeradas de um a três a partir do topo. Este método de inoculação foi adotado, a fim de obter os sintomas mais rapidamente. Após a inoculação, as plantas foram mantidas em câmara úmida feita com saco plástico transparente umedecido, onde as plantas permaneceram por 48 horas, à temperatura ambiente. As plantas foram mantidas em casa de vegetação até a avaliação dos sintomas.

Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, com três repetições, cada repetição constituiu-se de uma planta. A testemunha constou de plantas que receberam discos de meio de cultura sem o patógeno. Sete dias após a inoculação, foi feita a avaliação através da medição com régua, do diâmetro das lesões, tomando-se as medidas vertical e horizontal. O ensaio foi repetido duas vezes.

### **3.3. Inoculação de clones resistente e suscetível**

Os clones resistente e suscetível, selecionados como descrito no item 3.2, foram inoculados com o isolado do fungo também selecionado no ensaio já descrito.

### **3.3.1. Preparo do inóculo**

O fungo foi cultivado em placas de Petri contendo meio BDA, mantidas sob luz fluorescente constante e à temperatura ambiente, a fim de induzir a produção de conídios. Culturas com 10 dias de idade foram utilizadas para o preparo do inóculo.

### **3.3.2. Inoculação e coleta das amostras**

Trinta dias antes da inoculação, as mudas a serem inoculadas foram podadas para obtenção de folhas com estágio fenológico conhecido. Nove grupos de três plantas foram preparados para a inoculação.

As mudas foram inoculadas com suspensão de  $10^5$  conídios/ml, atomizada na face adaxial das folhas com DeVilbis nº 15, sem ferimentos. Após a inoculação, as plantas permaneceram em câmara úmida por 48 horas, preparadas da mesma maneira como descrito no item 3.2. Em seguida, as mudas foram mantidas em casa de vegetação, até o término da coleta das amostras. Esta foi efetuada em cada grupo de plantas, às 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas após a inoculação. As amostras consistiram das folhas novas e velhas. A idade das folhas foi determinada de acordo com as características descritas por Nascimento Filho e Moreira (dados não publicados) onde estágio 1 corresponde à folha reta, estágio 2 à folha marrom, estágio 3 à folha verde-clara e estágio 4 folha verde-escura. Foram consideradas folhas novas aquelas com características de 1 a 3 e folhas velhas aquelas em estágio fenológico 4.

As folhas coletadas foram cortadas em fragmentos de  $0,5 \text{ cm}^2$ . Parte destes fragmentos foram clareados, de acordo com o método descrito por LONGO et al. 1994, que consiste em deixar as amostras em cloral hidratado (250 g/100 ml de água destilada) durante cinco dias, seguido de três lavagens em água destilada. A outra parte das amostras foi fixada em FAA (formaldeído 35% - 10ml, álcool etílico 95% - 50ml, ácido acético glacial - 5ml, água destilada - 35 ml (SASS, 1958).

### **3.4. Quantificação dos eventos de pré-penetração em folhas novas e velhas clareadas de clone resistente e suscetível**

Esta avaliação teve por objetivo detectar diferenças nos eventos de pré-penetração, entre plantas resistente e suscetível e entre folhas de diferentes idades.

As amostras avaliadas foram coletadas nos períodos de 6 a 48 horas após a inoculação, clareadas conforme descrito no item 3.3. e coloridas com azul de algodão + lactofenol (100 ml de lactofenol, 1 ml de azul de algodão aquoso 1%, 20 ml de ácido glacial acético) (BYRNE et al., 1997 e MUNAUT e MARAITE, 1998). Os conídios presentes nas amostras foram avaliados quanto à germinação e à formação de apressório. Para cada intervalo de coleta, foram avaliados 300 conídios, observados ao microscópio de luz.

### **3.5. Observação da colonização dos tecidos**

Foram usadas as amostras coletadas às 24, 48, 72, 94 120 e 168 horas após a inoculação que foram incluídas em resina SPURR. Para isso, as amostras foram desidratadas em série alcóolica (30%, 50%, 70%, 80%, 95% e 100%) (BERLYN e MIKSCHE, 1976). Os fragmentos desidratados foram submetidos sucessivamente a álcool e resina (1:1v/v) durante trinta minutos, a álcool e resina (1:3v/v) por mais trinta minutos, a resina pura por 4 horas e, em seguida, a resina pura por 12 horas. As amostras do tecido foram emblocadas em moldes de silicone, devidamente etiquetados e levados para polimerização a 70°C por 24 horas.

O tecido incluído em resina SPURR foi seccionado a uma espessura de 1 µm usando-se ultramicrotomo marca SORVALL MT2-B, equipado com navalha de vidro. Os cortes foram coloridos com azul de toluidina O 0,1% (borax p.a. 0,1g; toluidina O 0,1g; 100 ml de água destilada) e observados ao microscópio de luz.

### **3.6. Microscopia eletrônica e varredura**

As amostras foliares, inoculadas com 24 e 48 horas, foram fixadas em FAA à temperatura ambiente. Em seguida, os fragmentos foram submetidos à desidratação em série alcóolica (30, 50, 70, 80, 95%) com intervalos de 10 minutos cada, seguido de 3 vezes em álcool 100% durante 20 minutos cada. O material foi seco ao ponto crítico (Critical Point Dryer 020 - Balzer Union) e coberto por um filme de ouro de 15nm de espessura, através de pulverização catódica. Após este processamento, as amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura a 10 KV (JSM - T200 JEOL).

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Reavaliação da identidade do agente causal da antracnose do guaranazeiro**

A colônia do fungo apresenta-se de coloração branca, com a produção abundante de micélio, quando cultivado em meio de cultura (BDA). Observou-se também a formação de massas de conídios de cor alaranjada. Os esporos são hialinos, de formato cilíndrico (Figura 1), medindo 10,5-15,5 x 3,0-4,5  $\mu\text{m}$ . Observou-se a presença de um septo transversal nos conídios germinados ou próximos da germinação. O tubo germinativo apresenta comprimento variado entre 0,1 a 5,0  $\mu\text{m}$ . O apressório apresenta-se de cor escura (melanizado) e forma globosa, podendo ter algumas variações (Figura 2). Suas dimensões variam de 4,5-8,0 x 5,0-8,  $\mu\text{m}$ . No hospedeiro, observou-se a presença de acérvulos na superfície do tecido, dos quais saía uma grande quantidade de esporos. Setas foram observadas em meio de cultura, mas não foram visualizadas nos acérvulos no hospedeiro.

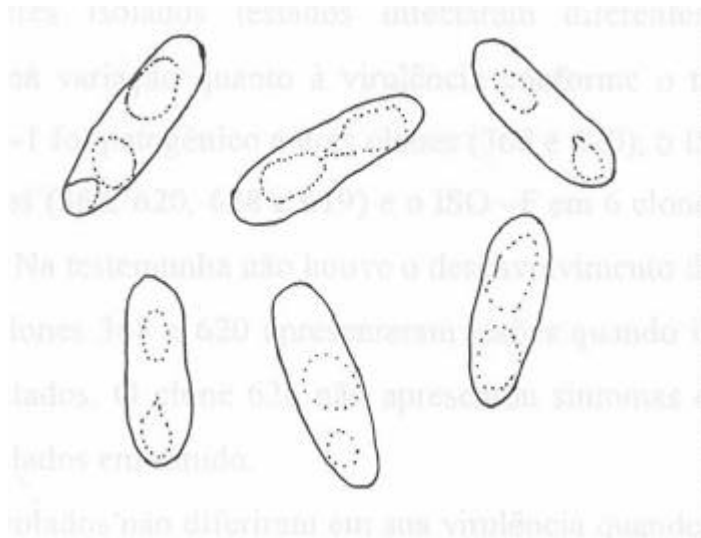


Figura 1 - Conídios de *C. guaranicola*, apresentando variação de tamanho e forma (Barra = 10  $\mu$ m).

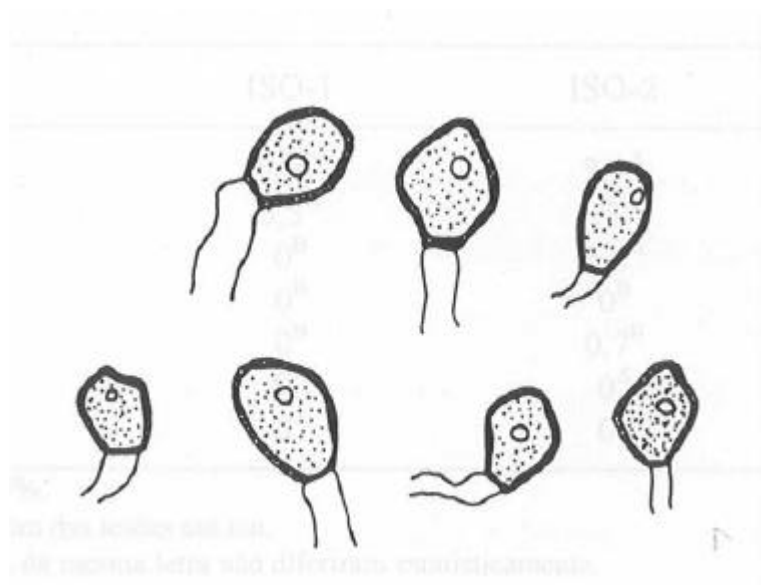


Figura 2 - Apressórios de *C. guaranicola*, com formas e tamanhos variados (Barra = 5,5 $\mu$ m).

## 4.2. Seleção de clones e isolado

Os três isolados testados infectaram diferentes clones, podendo-se observar uma variação quanto à virulência conforme o tamanho das lesões. O isolado ISO-1 foi patogênico a dois clones (368 e 620), o ISO-2 causou lesões em quatro clones (368, 620, 628 e 619) e o ISO -F em 6 clones (368, 620, 628, 619, 224 e 514). Na testemunha não houve o desenvolvimento de lesões.

Os clones 368 e 620 apresentaram lesões quando inoculados com os três isolados testados. O clone 626 não apresentou sintomas quando inoculado com todos os isolados em estudo.

Os isolados não diferiram em sua virulência quando inoculados nos clones 368, 626 e 514 (Quadro 1). Para o clone 620, os isolados ISO-1 e ISO-F foram os mais virulentos, tendo apresentado o maior diâmetro de lesões observado. Para os clones 224 e 619, o isolado ISO-F foi o mais virulento, diferindo estatisticamente dos demais.

Quadro 1 - Diâmetro de lesões causadas por isolados de *C. guaranicola* em diferentes clones de guaranazeiro

Clone	ISO-1	ISO-2	ISO-F
368	2,8 <sup>A</sup>	2,9 <sup>A</sup>	1,5 <sup>A</sup>
620	5,3 <sup>A</sup>	1,5 <sup>AB</sup>	3,3 <sup>B</sup>
628	0 <sup>B</sup>	2,6 <sup>A</sup>	1,6 <sup>AB</sup>
224	0 <sup>B</sup>	0 <sup>B</sup>	2,7 <sup>A</sup>
619	0 <sup>B</sup>	0,7 <sup>B</sup>	2,5 <sup>A</sup>
514	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0,8 <sup>A</sup>
626	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>	0 <sup>A</sup>

Teste de Tukey 5%.

Valores = diâmetro das lesões em cm.

Valores seguidos da mesma letra não diferiram estatisticamente.

Diante destes resultados, os clones selecionados foram 626, como genótipo resistente, e 368, como suscetível, devido à maior disponibilidade de mudas deste clone no viveiro. Como não houve diferença significativa entre os isolados quando inoculados nos clones 368 e 626, optou-se pelo uso do isolado ISO-1, por esporular com maior facilidade que os demais isolados avaliados quando exposto à luz constante.

### **4.3. Avaliação dos eventos de pré-penetração em clones resistente e suscetível**

#### **4.3.1. Germinação**

Em ambos os clones não se observou germinação de conídios no período de 6 horas após a inoculação (h.a.i.). A germinação iniciou-se entre 6 e 12 h.a.i. quando alguns conídios haviam originado um tubo germinativo. Em ambos os clones, a germinação segue uma tendência crescente com o tempo após a inoculação. De acordo com a análise estatística, há diferença significativa entre os clones, quanto à germinação dos conídios (Tukey 5%) (Figura 3).

#### **4.3.2. Formação de apressórios**

No período entre 6 e 12 h.a.i. os conídios germinados deram origem a um apressório melanizado tanto no hospedeiro suscetível quanto no resistente. Com 24 h.a.i., a porcentagem de formação de apressório foi maior no clone suscetível (63% no suscetível e 42,7% no resistente). Já no período de 48 h.a.i., os valores entre os clones foram bem próximos, não apresentando diferença estatística pelo teste de Tukey 5% (Figura 4). Deste modo, parece haver uma diferença quantitativa entre os clones, em relação à formação de apressório somente no período de 24 h.a.i.

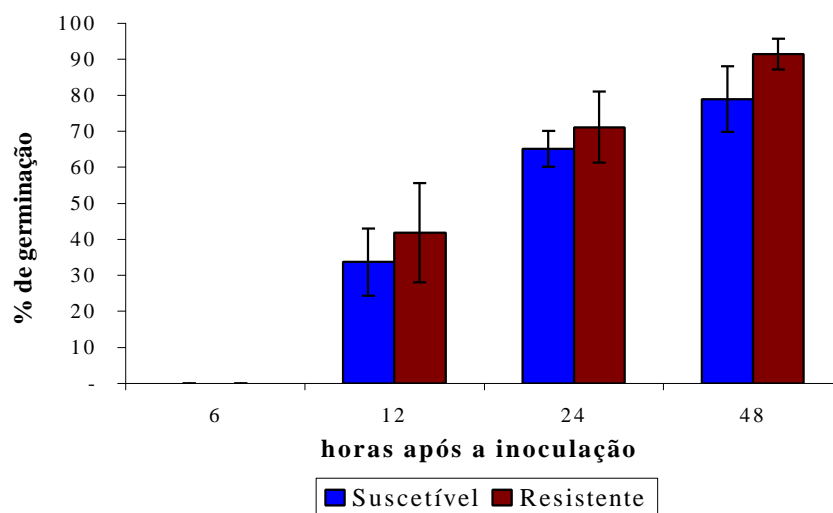


Figura 3 - Germinação de conídios em clones de guaranazeiro resistente e suscetível a *C. guaranicola* (as barras nas colunas representa o desvio-padrão médio).

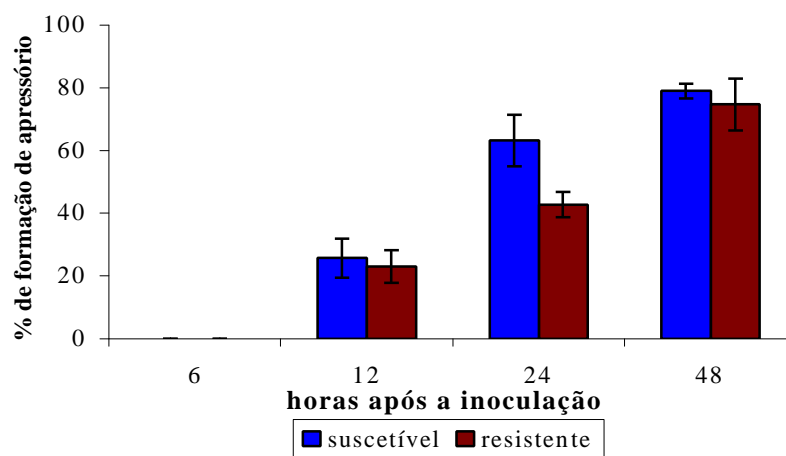


Figura 4 - Formação de apressório em clones de guaranazeiro resistente e suscetível a *C. guaranicola* (as barras nas colunas representam o desvio-padrão médio).

#### **4.4. Avaliação dos eventos de pré-penetração em folhas novas e velhas dos clones resistente e suscetível**

##### **4.4.1. Germinação**

Em folhas novas, observou-se que com 12 h.a.i. parece não haver diferença entre os clones. No período de 24 h.a.i., observa-se que no clone suscetível houve mais germinação que no resistente. Porém, com 48 h.a.i., a porcentagem de germinação parece não diferir entre os clones (Figura 5). O clone suscetível difere significativamente (Tukey 5%) quanto à germinação em folhas novas e velhas, sendo maior em folhas novas.

O clone resistente não mostrou diferença quanto à germinação de conídios em folhas novas e velhas (Tukey 5%) (Figura 6).

##### **4.4.2. Formação de apressório**

A formação de apressório foi significativamente maior em folhas novas, tanto para o clone suscetível quanto para o resistente (Tukey 5%). Esta diferença pode ser observada no período de 48 h.a.i., quando, em folhas novas, a porcentagem atinge níveis superiores a 80% para os dois clones enquanto em folha velha fica em 75%. No período de 24 h.a.i., em folhas novas observou-se que o material suscetível formou uma quantidade de apressório muito acima daquela observada no resistente (Figuras 7 e 8).

#### **4.5. Processo de infecção e colonização dos tecidos**

##### **4.5.1. Pré-penetração**

Na superfície do hospedeiro, os conídios aderem-se fortemente, e quando removidos é possível observar uma “cicatriz” deixada pelo mesmo no local de adesão (Figura 9(A)). O tubo germinativo e apressório também apresentam-se em estreito contato com o hospedeiro (Figura 9(B)).

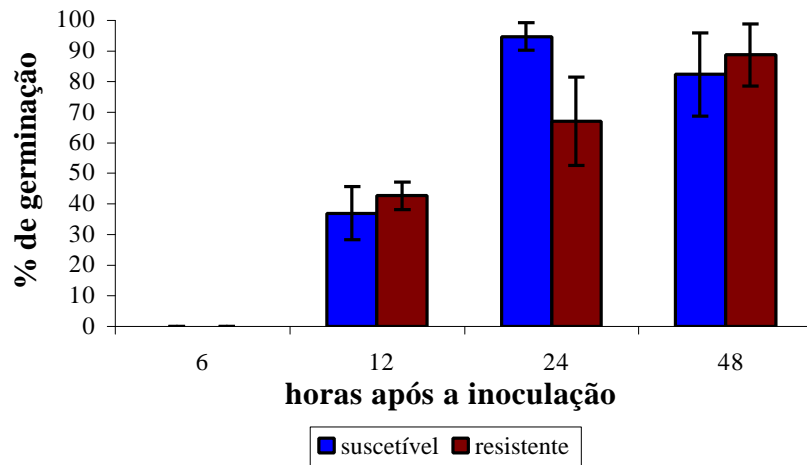


Figura 5 - Germinação de conídios em folha nova de clones resistente e suscetível a *C. guaranicola*.

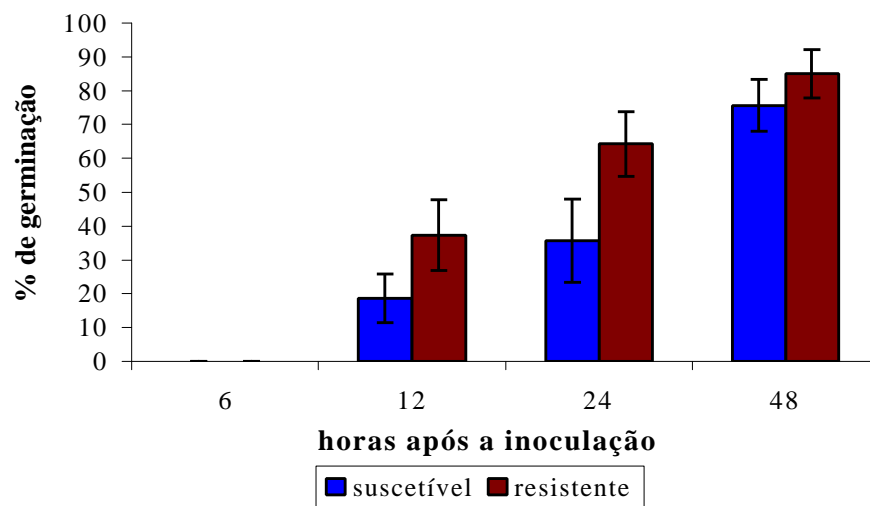


Figura 6 - Germinação de conídios em folha velha de clones resistente e suscetível a *C. guaranicola*.

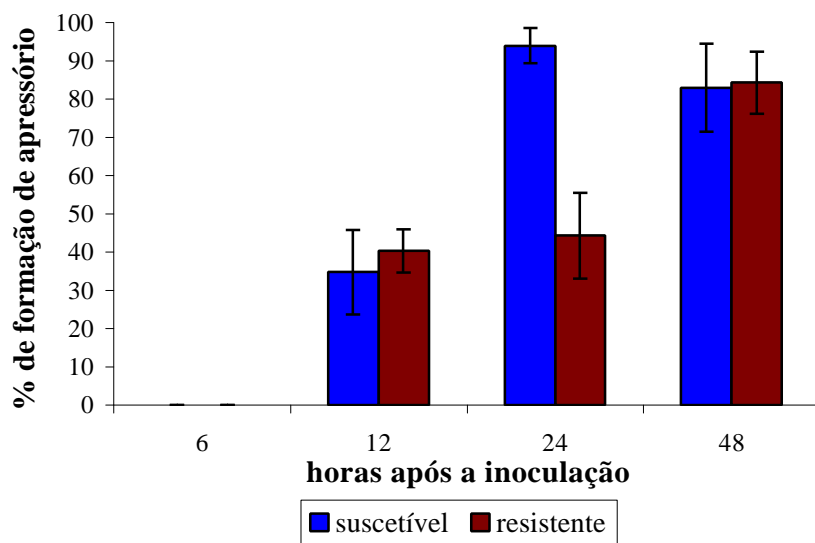


Figura 7 - Formação de apressório em folhas novas em clones resistente e suscetível a *C. guaranicola*.

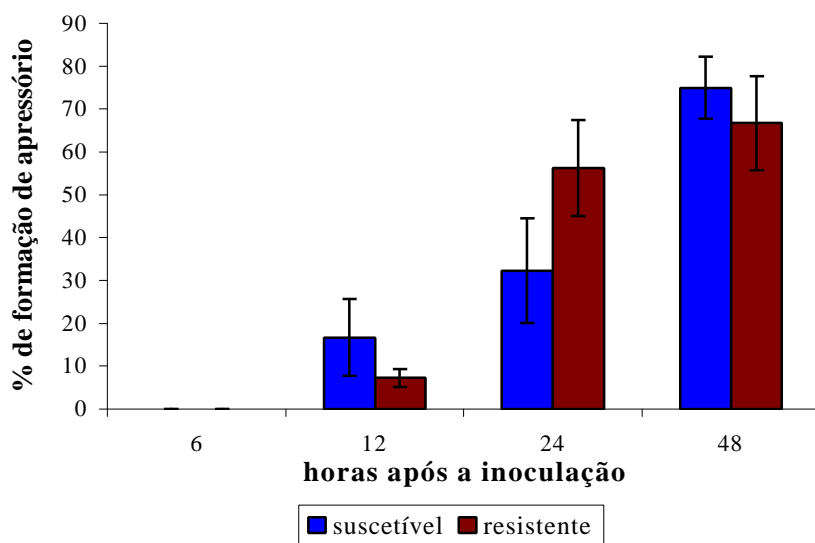


Figura 8 - Formação de apressório em folhas velhas de clone resistente e suscetível a *C. guaranicola*.

Os eventos que antecedem a penetração se iniciam com germinação dos conídios, através de um tubo germinativo, que dá origem, na maioria dos casos, a um apressório globoso e melanizado (Figura 10(A)). Formado o apressório, encerram-se os eventos de pré-penetração e iniciam-se os de penetração.

#### **4.5.2. Penetração**

No apressório encontra-se o cone apressorial (Figura 10(B)), através do qual o fungo emite uma hifa de infecção para o interior da célula (Figura 10(C)), que atravessa a cutícula e a parede celular de células da epiderme. Após penetrar na parede celular, a hifa de infecção vai dar origem a uma vesícula de infecção e hifa primária (Figura 10(D)), que se forma abaixo da parede celular da célula epidérmica.

#### **4.5.3. Colonização dos tecidos**

A hifa primária cresce na célula inicialmente infectada e passa a colonizar as células adjacentes da epiderme (Figura 10(E)). Em seguida, ramifica-se para colonizar inter e intracelularmente o parênquima (Figuras 10(F) e 10(G)), danificando as células, que mais tarde serão totalmente tomadas pelas hifas (Figura 10(H)), surgindo então áreas necróticas no tecido colonizado. A colonização prossegue pelo tecido foliar, através da ramificação das hifas, que irão colonizar células adjacentes, ampliando assim a área necrosada e causando os sintomas típicos da doença.

Tanto no clone resistente quanto no suscetível, foram encontradas alterações na parede celular e papilas nas células da epiderme (Figuras 11(A), 11(B) e 11(C)), que são vistas ao microscópio como uma “massa” que se forma na região abaixo do apressório, no sítio de penetração.

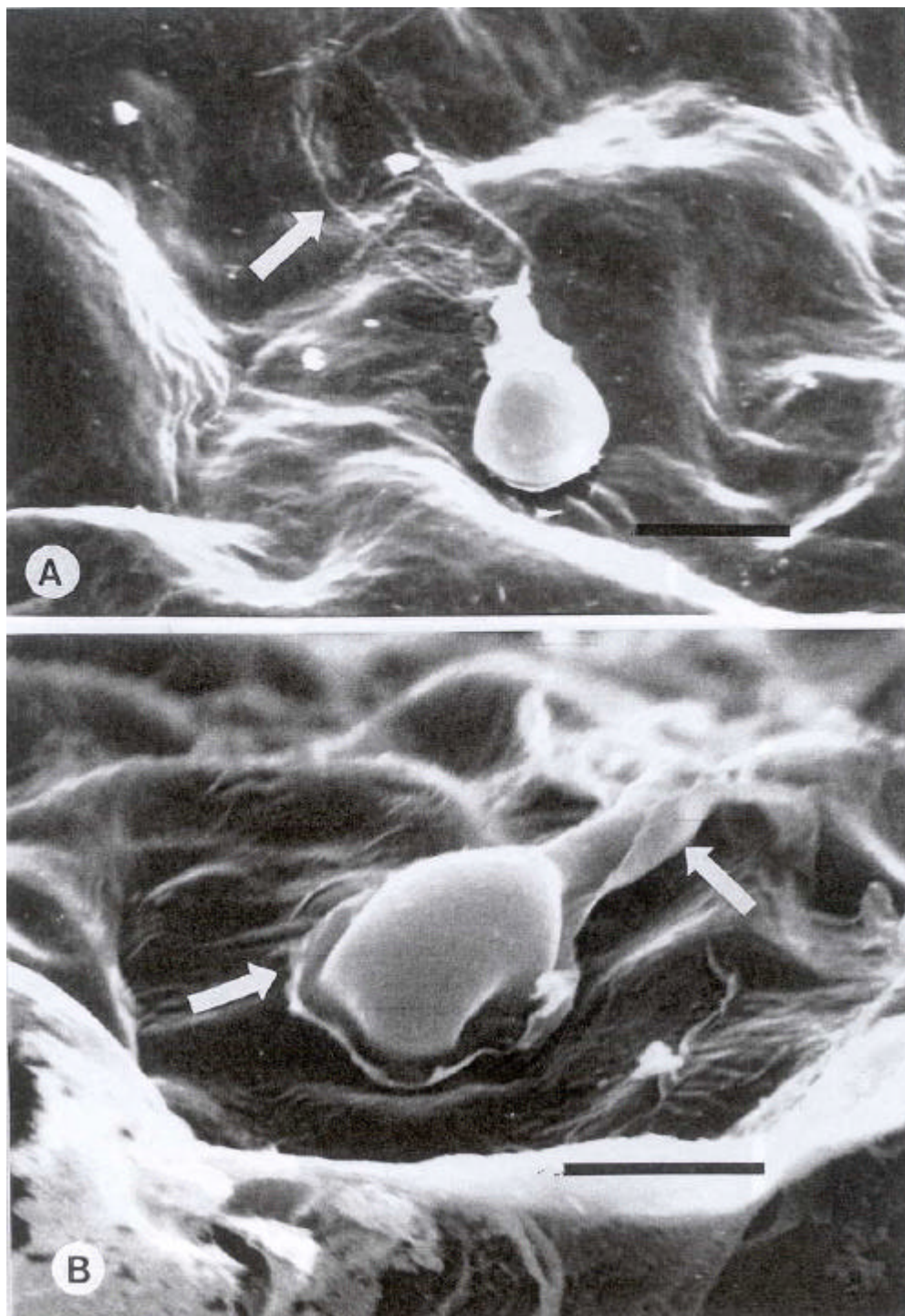


Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura. A) Cicatriz deixada pelo conídio (seta) e apressório. B) Apressório aderido à superfície do hospedeiro. Não foi possível diferenciar a natureza do material aderido ao tubo germinativo e apressório (setas), possivelmente trata-se de substância adesiva ou cutícula do hospedeiro (Barra em A e B = 5  $\mu$ m).

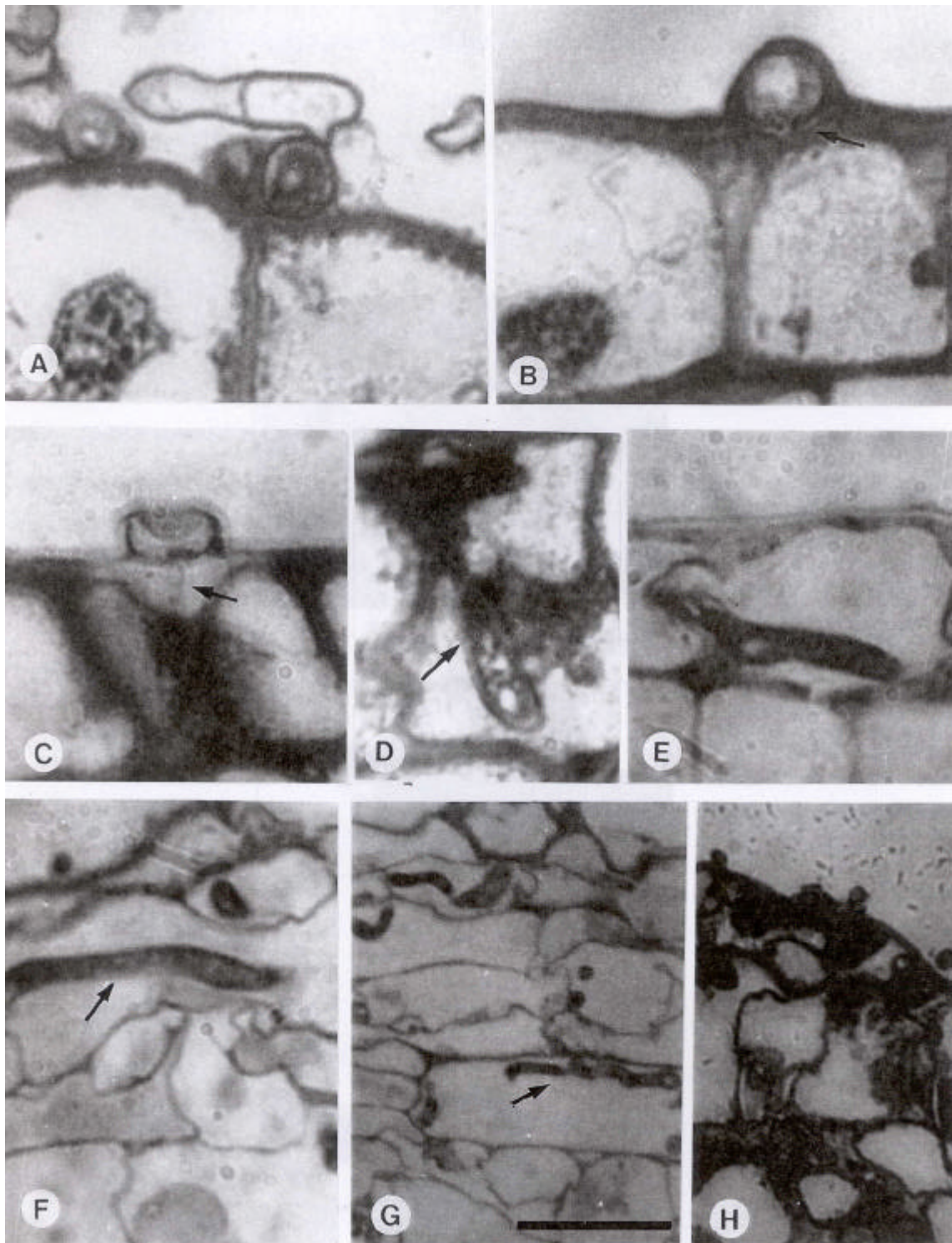


Figura 10 - Processo de infecção de *C. guaranicola* em guaranazeiro. A) Conídio germinado com apressório na superfície do hospedeiro. B) Apressório com cone apressorial (seta). C) Hifa de infecção penetrando (seta). D) Hifa primária em célula epidérmica. E) Hifa ramificando em célula epidérmica. F e G) Colonização de células epidérmicas e do parênquima (setas). H) Tecido colonizado e necrosado (Barra em A, B, C, D, E, F = 10  $\mu$ m, em G e H = 25  $\mu$ m).

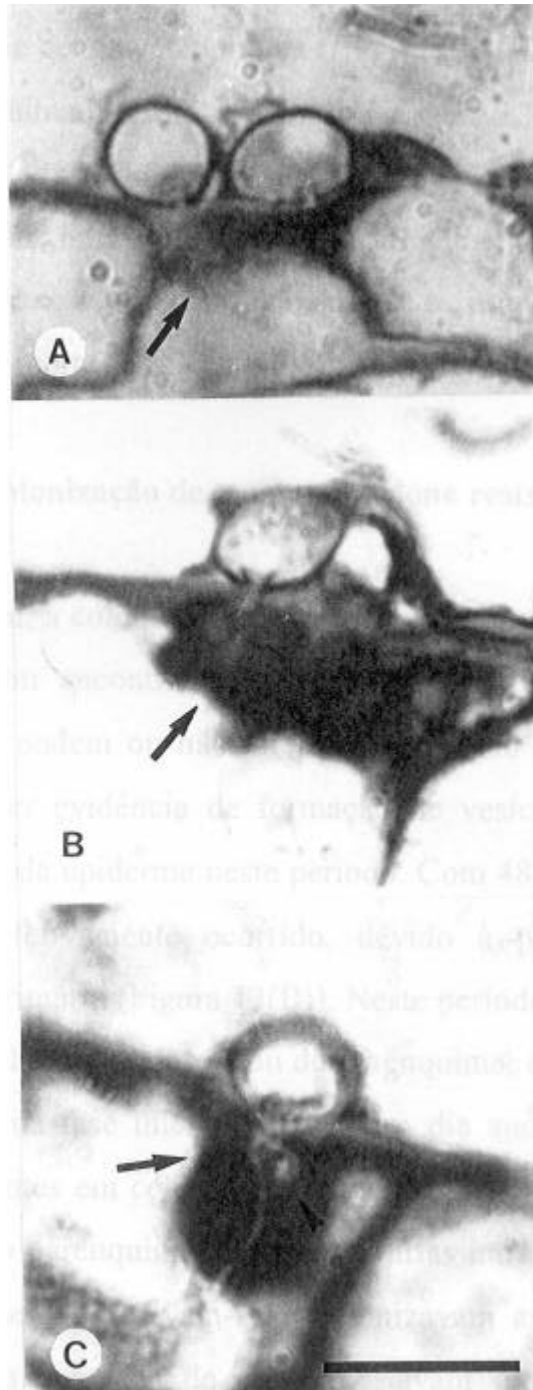


Figura 11 - Formação de papila (seta) em material resistente (A, B) restringindo a penetração, e suscetível (C) aparentemente a hifa de infecção atravessa a papila (Barra = 10  $\mu$ m).

#### **4.6. Penetração e colonização de tecidos em clone suscetível**

Neste clone observou-se que, com 24 horas após a inoculação (h.a.i.), a penetração nas células da epiderme havia ocorrido, devido à presença de apressório exibindo cone apressorial (Figura 12(A)), e de vesícula de infecção com hifa primária (Figura 12(B)) assim como hifas que haviam ramificado e invadido o interior de células epidérmicas (Figuras 12(C) e 12(D)). Com 48 h.a.i., as células do parênquima estavam colonizadas (Figura 12(E)). No terceiro e quarto dias após a inoculação, as células da epiderme e do parênquima estavam totalmente colonizadas por hifas intra e intercelulares (Figura 12(F)), e apresentavam-se estruturalmente disformes. No quinto dia, surgem os primeiros sintomas necróticos, devido à destruição e morte das células infectadas (Figura 12(G)).

#### **4.7. Penetração e colonização de tecidos em clone resistente**

Neste material, a colonização dos tecidos ainda não havia sido iniciada até 24 h.a.i., pois foram encontrados somente apressórios com cone apressorial (Figura 13(A)) que podem ou não ter penetrado. Não se encontravam hifas de infecção ou qualquer evidência de formação de vesícula de infecção ou hifa primária nas células da epiderme neste período. Com 48 h.a.i., observou-se que a penetração havia efetivamente ocorrido, devido à presença de vesícula de infecção com hifa primária (Figura 13(B)). Neste período, não foram encontradas hifas em outras células da epiderme ou do parênquima, o que se leva a crer que a colonização estaria na fase inicial. No terceiro dia após a inoculação, algumas hifas estavam presentes em células da epiderme (Figura 13(C)), e no quarto dia após a inoculação, o parênquima apresentava hifas intra e intercelulares (Figuras 13(D) e 13(E)), que ramificavam-se e colonizavam as células adjacentes. No quinto dia, todas as camadas de células estavam tomadas por hifas intra e intercelulares, com células disformes (Figura 13(F)), porém somente no sétimo dia após a inoculação é que se observou o surgimento de sintomas necróticos no tecido, com células totalmente destruídas (Figura 13(G)).

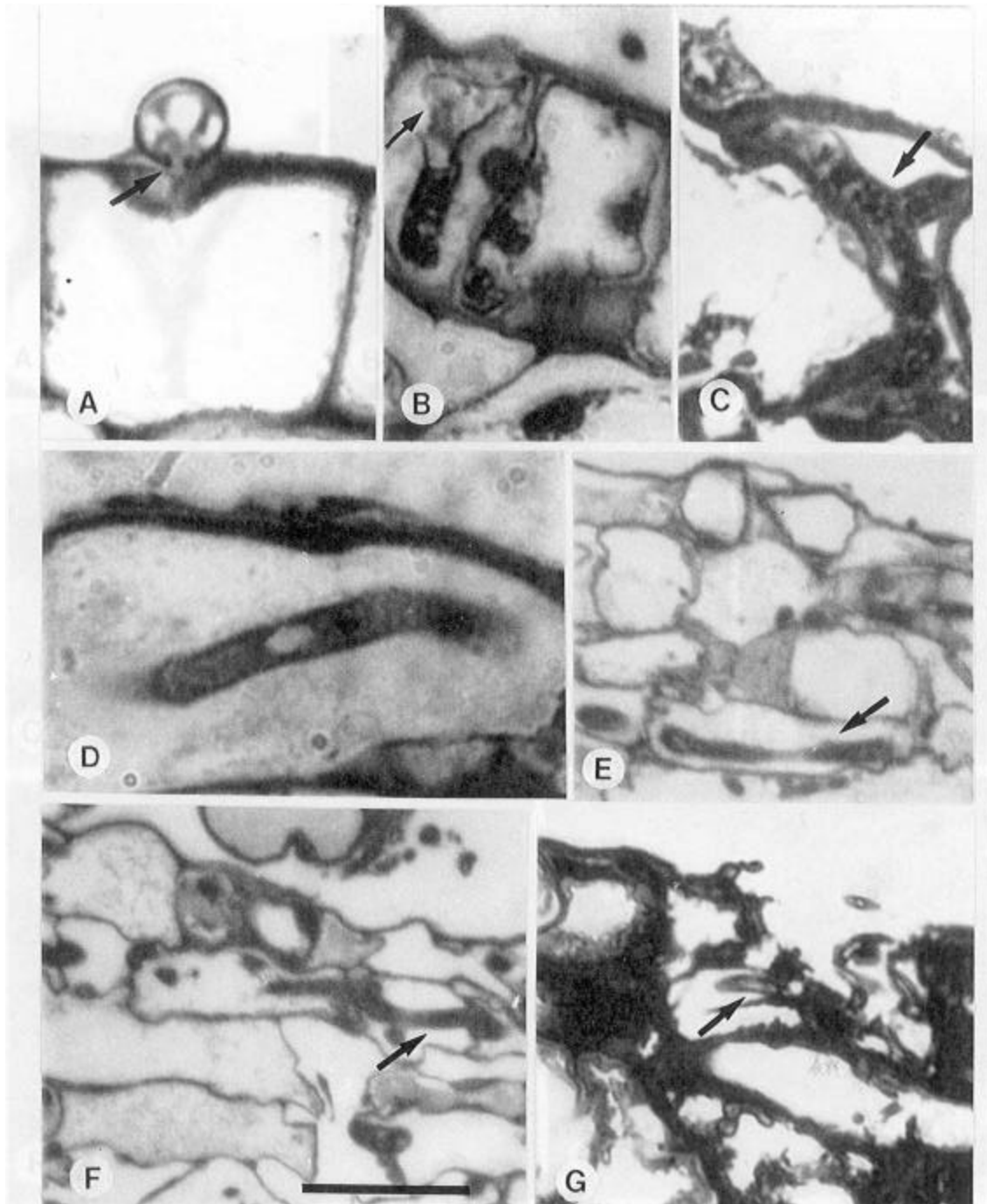


Figura 12 - Processo de infecção no clone suscetível. A) Penetração e apressório com cone apressorial (seta), 24 h.a.i. B) Vesícula de infecção (seta) e hifa primária, 24 h.a.i. C) Ramificação de hifa, 24 h.a.i. D) Hifa em célula epidérmica, 24 h.a.i. E) Colonização de células do parênquima (seta), 48 h.a.i. F) Colonização de tecidos (seta), sem necrose, 96 h.a.i. G) Tecido colonizado e necrosado (seta), 120 h.a.i. (Barra em A, B, C, D = 10  $\mu$ m, em E, F, G = 25  $\mu$ m).

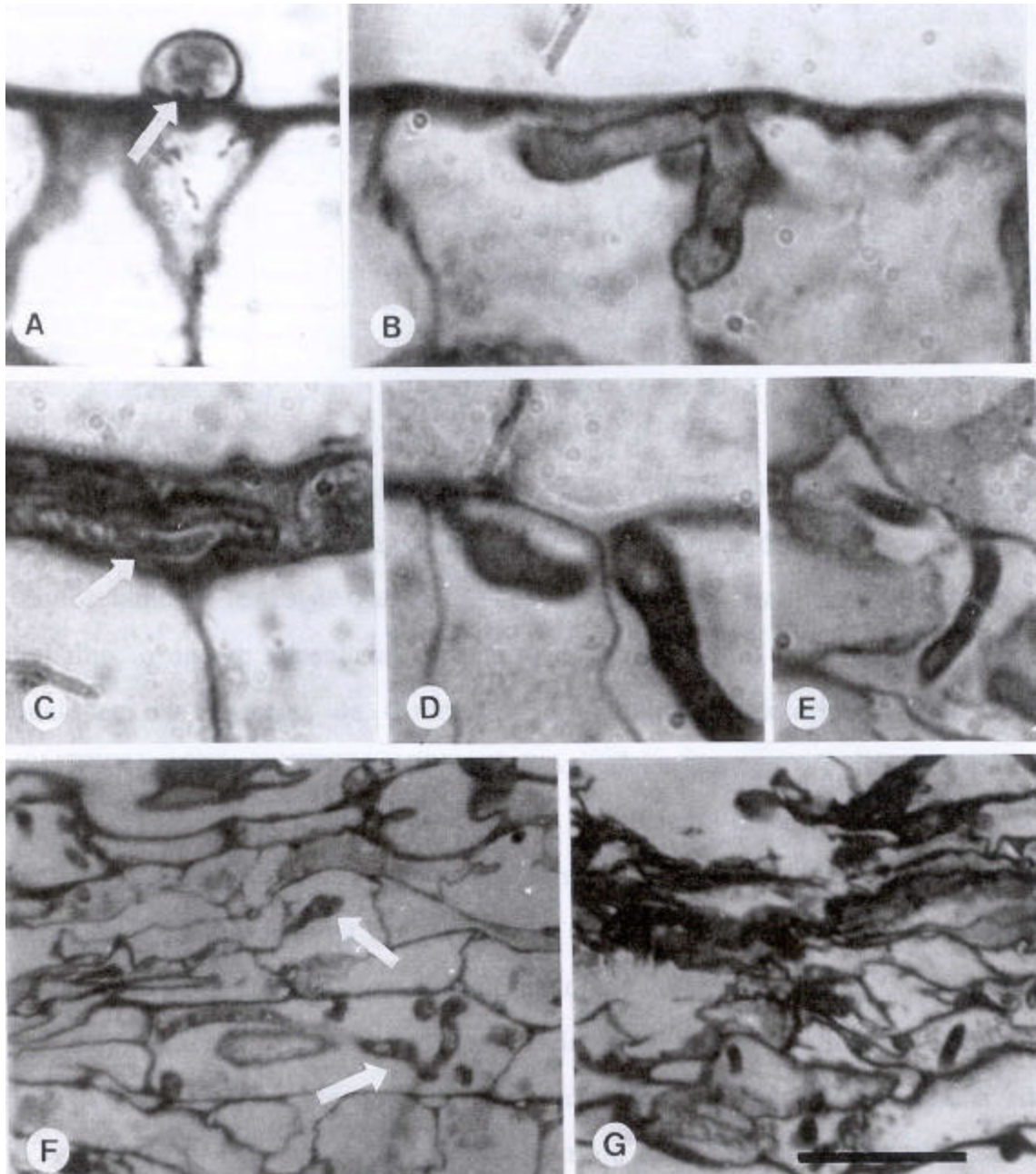


Figura 13 - Processo de infecção e colonização em clone resistente. A) Apressório com cone apressorial (seta), sem hifa de infecção, 24 h.a.i. B) Hifa primária, 48 h.a.i. C) Hifa em célula epidérmica (seta), 72 h.a.i. D e E) Hifa intracelular em células do parênquima, 96 h.a.i. F) Colonização de todas as camadas de células (setas), 120 h.a.i. G) Tecido colonizado com necrose, 168 h.a.i. (Barra em A, B, C, D e E = 10  $\mu$ m, em F e G = 25  $\mu$ m).

## 5. DISCUSSÃO

De acordo com SUTTON (1992), a identificação de espécies de *Colletotrichum* é baseada em características morfológicas do fungo, podendo ser usados também testes de gama de hospedeiros. Pelos resultados obtidos neste trabalho, o agente causal da antracnose do guaranazeiro não se enquadra em qualquer das espécies de *Colletotrichum* atualmente descritas na literatura (SUTTON, 1980; SUTTON, 1992). *Colletotrichum guaranicola* difere de outras espécies de *Colletotrichum* com conídios cilíndricos, atualmente aceitas, pelo tamanho do conídio e pelo tamanho e forma do apressório (Quadro 2). Outras espécies diferem do fungo em estudo não só pelas características morfológicas, mas também por apresentarem especificidade de hospedeiro, como *C. coffeanum* em café, *C. caricae* em frutos de mamão e *C. musae* em frutos de banana (SUTTON, 1992). Até o momento não foi descrita a ocorrência de *C. guaranicola* em outros hospedeiros além do guaranazeiro, sendo necessários testes de gama de hospedeiros, para que se possa afirmar a ocorrência de especificidade neste patossistema. Outras características, como a coloração da colônia, aspecto do micélio e presença de setas, são difíceis de serem comparadas devido à grande variação entre espécies e entre isolados dentro da mesma espécie de *Colletotrichum*.

Quadro 2 - Espécies do gênero *Colletotrichum* com conídios cilíndricos

Fungo	Tamanho do Conídio (µm)	Apressório	Tamanho do Apressório (µm)
<i>C. guaranicola</i>	10.5-15.5 x 3-4.5	Globoso	4.5-8 x 5-8.5
<i>C. gloeosporioides</i>	12-17 x 3.5-6	Clavado, oval.	6-20 x 4-12
<i>C. crassipes</i>	14-28 x 5-7	Clavado, oval	10.5-14 x 7-9.5
<i>C. fragariae</i>	12.5-16.5 x 4.5-5	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. fusarioides</i>	18-32 x 4.5-6	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. fuscum</i>	15-21 x 3.5-4	Oval	4,0 x 7,0
<i>C. lindemuthianum</i>	9.5-11.5 x 3.5-4.5	Clavado, oval	8,0 x 6-7
<i>C. malvarum</i>	12-24 x 4-6	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. nigrum</i>	15-21 x 3.5-6.5	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. nimpheae</i>	12-23 x 4-5.5	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. paludosum</i>	18-28 x 6-8	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. phyllachoroides</i>	18-24 x 4-6.5	Não há descrição	Não há descrição
<i>C. trifolii</i>	6-18 x 4-8	Clavado, oval	Não há descrição
<i>C. typhae</i>	11.5-21 x 3.5-5	Clavado, oval	8-11 x 5-9

Fonte: SUTTON (1992).

O presente estudo reforça o reconhecimento da espécie *C. guaranicola*, como um táxon distinto dentro do gênero *Colletotrichum*, segundo apresentado por ALBUQUERQUE (1961). É provável que o não reconhecimento desta espécie por Sutton seja devido ao fato dela ter sido descrita em publicação em língua portuguesa e de circulação limitada, não chegando ao conhecimento deste autor.

*Colletotrichum guaranicola* apresenta variação na virulência, conforme o genótipo do hospedeiro. Segundo DODD et al. (1992) e WALLER (1992), a patogenicidade de isolados de fungos fitopatogênicos está relacionada com fatores do ambiente, com o genótipo do hospedeiro e com outros fatores da interação patógeno-hospedeiro, como a secreção de enzimas pelo fungo ou idade dos tecidos a serem infectados.

Durante o ensaio de seleção dos clones e do isolado a serem utilizados neste trabalho, não se observou qualquer sintoma da doença no clone 626 quando inoculado com os isolados em estudo. Porém, nas inoculações seguintes, este apresentou sintomas equivalentes aos observados no clone suscetível. Entretanto,

no suscetível, os sintomas foram observados cinco dias após a inoculação, enquanto no resistente os sintomas só começaram a surgir a partir do sétimo dia após a inoculação. O fato de o clone resistente passar a manifestar sintomas pode estar relacionado a diversos fatores genéticos e ambientais, desconhecidos neste caso. No clone 626 não se observa sintomas da antracnose em campos de produção, segundo informação pessoal (pesquisador José Firmino da Embrapa Amazônia Ocidental). Porém, no presente trabalho este material apresentou os sintomas da doença quando foi inoculado em casa de vegetação. Tal comportamento pode ser atribuído à idade das folhas inoculadas, visto que o desenvolvimento das lesões está relacionado com a idade dos tecidos afetados (BATISTA, 1983; DUARTE et al., 1995). No ensaio de seleção do material, as mudas utilizadas apresentavam folhas velhas em sua maioria, as quais não manifestaram sintomas. Já nas inoculações seguintes, as mudas haviam passado por uma poda, e as inoculações foram feitas em folhas bem mais novas que aquelas utilizadas anteriormente, o que pode ter favorecido o desenvolvimento dos sintomas em folhas novas, já que folhas velhas não desenvolveram sintomas até sete dias após a inoculação, quando foi feita a última coleta das amostras. O fato de que em condições de campo as plantas apresentam folhas totalmente desenvolvidas em sua maioria e aliado à possibilidade da densidade de inóculo que chega na superfície do hospedeiro em condições naturais não seja suficiente para desencadear um processo de doença, e às condições adversas do meio ambiente no campo, o que não ocorre em inoculações em condições controladas como temperatura e umidade, pode também estar relacionado com a não observação de sintomas no campo, e sim em casa de vegetação. O método de inoculação usado pode também ter interferido na manifestação de sintomas. ROCHA et al. (1998), ao avaliarem a patogenicidade de isolados de *C. gloeosporioides* em frutos de maracujá, observaram uma grande variação na expressão dos sintomas, de acordo com o método de inoculação usado. Nas primeiras inoculações feitas, visando selecionar os clones, não houve manifestação de sintomas pelo clone resistente. Nestas inoculações, o

procedimento foi diferente do posterior, havendo a provocação de ferimentos e deposição e discos de meio de cultura contendo massas de conídios e micélio do fungo. Este método de inoculação pode ter induzido a síntese e acúmulo de compostos fenólicos no local de ferimento no clone resistente. Isto, aliado à alta concentração de inóculo, pode ter impedido o estabelecimento do patógeno devido à inibição da germinação por substâncias presentes na massa e conídios, comuns em espécies de *Colletotrichum*. Já nas inoculações feitas nos ensaios posteriores, quando houve manifestação de sintomas pelo clone resistente, foram feitas por atomização de suspensão de inóculo, sem ferimento, além de terem sido usadas folhas novas, permitindo o desenvolvimento dos sintomas.

A germinação dos conídios teve início no período entre 6 e 12 horas após a inoculação, independente do genótipo do hospedeiro ou da idade da folha, e cresce progressivamente com o tempo após a inoculação. Comparando-se os clones resistente e suscetível, observa-se uma diferença quanto à germinação entre os clones, sendo maior no resistente. Ao que parece, esta diferença na germinação não interfere na colonização, pois quando se observa os dados de formação de apressório melanizado, nota-se que esta é maior no clone suscetível no período de 24 h.a.i., como será discutido posteriormente. Esta diferença pode se refletir na colonização dos tecidos e manifestação dos sintomas por este clone, pois não se observou penetração direta sem a formação de apressório ou via estômatos por *C. guaranicola*, ao contrário do que ocorre em *C. acutatum* em pétalas de flores de citrus, que penetra em geral por via direta sem formar apressório (ZULFIQAR et al.,1996).

Pela avaliação dos eventos de pré-penetração em folhas de idades diferentes, a porcentagem de germinação não foi diferente para folhas novas e velhas no clone resistente, porém, no clone suscetível a germinação foi maior em folhas novas. Quanto à formação de apressório, esta foi maior em folhas novas de ambos os clones, mostrando que há diferença nos eventos de pré-penetração conforme a idade dos tecidos, sendo mais evidente quanto à formação de

apressório, o que pode explicar a maior suscetibilidade de órgãos jovens do guaranazeiro ao ataque do fungo (BATISTA, 1983; DUARTE et al., 1995).

A menor porcentagem de germinação e formação de apressórios em folhas velhas pode estar relacionada com a composição da cutícula, que pode comportar-se como uma superfície hidrofóbica, que dificulta a formação do filme de água necessário à germinação e conseqüente diferenciação de estruturas de infecção (PASCHOLATI e LEITE, 1995). A adesão do esporo na superfície do hospedeiro tem sido reconhecida por vários autores como evento essencial para o sucesso da infecção (MENDEGEM et al., 1988; MENDEGEN e DEISING, 1993; EPSTEIN e NICHOLSON, 1997). Ao avaliarem a influência da adesão dos conídios de *C. graminicola* em folhas de milho no desenvolvimento da doença (MERCURE et al., 1994), observaram que as folhas mais novas apresentavam maior porcentagem de conídios aderidos que as mais velhas. Segundo estes autores, esta diferença depende não somente do conídio mas também de mudanças na topografia da superfície do hospedeiro, devido à deposição de cera, o que altera a sinalização topográfica necessária para a diferenciação das estruturas do fungo. Os autores sugerem ainda que, estes resultados influenciam diretamente o desenvolvimento da doença, pois uma rápida adesão dos conídios na superfície do hospedeiro aumenta a chance de sucesso no estabelecimento do patógeno. No presente trabalho não foi avaliada a adesão dos conídios. Assim, não se pode afirmar se há diferença, quanto a este evento, entre os clones e entre folhas de diferentes idades que possa estar relacionada com a resistência ou suscetibilidade destes tecidos. Da mesma forma, não foram avaliadas a espessura da cutícula nem a topografia das folhas inoculadas. Porém, foi possível observar que a superfície das folhas velhas apresenta menor capacidade de retenção de água que as folhas novas, o que pode ser um reflexo da quantidade de cera presente na cutícula.

No clone resistente não houve diferença quanto à germinação em folhas de diferentes idades. Porém, a formação e apressório foi maior em folhas novas, mostrando de maneira similar ao que ocorre no clone suscetível, que as folhas

velhas são mais resistentes. Esta diferença quanto à formação de apressório pode ser devida às mudanças na topografia das folhas velhas, como dito anteriormente, ou à composição química da superfície, que segundo BAYLEI et al. (1992), existem evidências de que a natureza química da superfície do hospedeiro pode influenciar na formação de apressório

O apressório de *C. guaranicola* apresenta uma estrutura chamada de cone apressorial, com forma de funil. (SKIPP et al., 1995) citam que, o cone apressorial é composto de material de parede fúngica e que se forma junto ao poro germinativo. A função do cone ainda não está bem esclarecida, mas acredita-se que atue como foco de pressão hidrostática que impulsiona a hifa de infecção para o interior da célula epidérmica do hospedeiro (BAYLEI et al., 1992). Nem todas as espécies de *Colletotrichum* apresentam esta estrutura, a qual não observada, por exemplo em *C. graminicola* (BAYLEI et al., 1992). Esta variação na presença de cone pode estar relacionada a diferentes modos de penetração, talvez porque algumas espécies utilizem maior força mecânica para penetrar no hospedeiro e nestes o cone serve como reforço da parede na base da hifa de infecção (SKIPP et al., 1995). Em outras espécies a força mecânica é usada em menor intensidade e a penetração é mediada principalmente pela degradação enzimática dos componentes da cutícula e parede celular, sendo desnecessária a presença do cone apressorial.

*Colletotrichum. guaranicola* coloniza os tecidos do hospedeiro de maneira semelhante àquela observada em muitos fungos hemibiotróficos descrita por SKIPP et al. (1995). No presente trabalho foi observado que após a penetração, o fungo desenvolve uma vesícula. A partir desta vesícula, surge uma hifa primária, que vai colonizar a célula inicialmente infectada e as células adjacentes, causando a desorganização do protoplasma celular e a morte das células infectadas, onde o fungo continua a se desenvolver. A colonização do tipo hemibiotrófica ocorre em outras espécies de *Colletotrichum*, como em *C. gloeosporioides* f.sp. *malvae* e malva, onde se observa uma fase biotrófica no hospedeiro, 72 horas após a inoculação, com hifas primárias nas células do mesófilo, e uma fase necrotrófica

120 horas após a inoculação (MORIN et al., 1996). Processos semelhantes foram descritos nos patossistemas *C. truncatun* e *Pisum sativum* (O'CONNELL et al., 1993) e *C. sublineolum* e sorgo (WHARTON e JULIAN, 1996).

Comparando-se o clone suscetível com o resistente, observa-se que o desenvolvimento do fungo ocorre da mesma maneira em ambos, apesar de haver uma diferença temporal nos eventos de penetração e colonização dos tecidos nestes clones. No clone suscetível, após 24 horas da inoculação, já é possível observar a colonização de células da epiderme, enquanto no resistente esta colonização só é vista no terceiro dia após a inoculação. Esta diferença é refletida no surgimento dos sintomas, pois no clone suscetível os sintomas surgem 5 dias após a inoculação, enquanto que no resistente somente 7 dias após a inoculação. A diferença na penetração e colonização observada com 24 h.a.i. pode estar relacionada à maior porcentagem de formação de apressórios no clone suscetível neste período (Figura 5). Em vista da maior quantidade de apressório, houve maior penetração e conseqüente colonização de tecidos neste material. No clone resistente, a quantidade de apressórios formados neste período é menor e devido ao pequeno tamanho dos fragmentos de folhas inoculadas, submetidas a cortes semi finos e à espessura dos cortes, apesar de ter sido cortada uma grande quantidade de amostras, a penetração não foi observada com 24 h.a.i. neste material, podendo ter ocorrido ou não. O fato de no período de 48 h.a.i. a quantidade de apressórios formados ser semelhante entre os dois clones, reforça a hipótese da influência da quantidade de apressório na penetração e colonização, pois neste período foi possível observar penetração e início de colonização dos tecidos do clone resistente.

Em algumas células, observou-se a formação de papilas, tanto no clone resistente quanto no suscetível. A formação de papilas é encontrada naquelas células que estão em estreito contato com o patógeno, e são formadas em resposta à infecção em plantas resistentes e suscetíveis, visando evitar o estabelecimento do patógeno em seus tecidos (ESQUERRÉ-TUGAYÉ et al., 1992). Porém, nem sempre as papilas são efetivas em restringir a penetração do patógeno no

hospedeiro, o que é atribuído a diferenças entre as células dos hospedeiros, entre outros fatores intrínsecos do patógeno e do hospedeiro (AIST, 1983). Em estudo relacionando a formação de papilas com o tipo de células de *Hordeum vulgare* resistente e suscetível a *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*, a porcentagem de papilas associadas à resistência foi a mesma para ambos os genótipos testados, porém a frequência de papilas foi maior em células mais longas do tecido foliar que em células curtas. No entanto, os autores não propuseram uma explicação para esta diferença, de acordo com a morfologia da célula (KOGA et al., 1990). Em análise citológica da interação *C. trifolii* e *Medicago sativa*, após a penetração do patógeno, a resposta do hospedeiro foi similar tanto para o suscetível quanto para o resistente, e se manifestou com a secreção de componentes da parede celular e síntese de papilas. Porém, no material suscetível, o fungo atravessou a papila e colonizou os tecidos, enquanto que no resistente o patógeno foi retido nestas células (MOULD e ROBB, 1992). A velocidade da formação da papila é um fator que pode influenciar na retenção do patógeno. MATSUOKA (1988) verificou que a resistência de pimentão a *Phytophthora capsici* se manifesta através da rápida formação de papilas em resposta à penetração da hifa infectiva. Apesar de não ter sido feita uma avaliação quantitativa da formação de papila nos clones de guaranazeiro, a frequência destas aparentemente não diferencia quando comparados o clone suscetível e o resistente. Desta maneira, pode-se supor que a presença de papilas não influencia na colonização dos tecidos nem na manifestação da resistência pelo clone 626.

A síntese de fitoalexinas, assim como a presença de proteínas na parede celular, como extensinas, também podem interferir na colonização dos tecidos das plantas, como demonstrado no estudo feito em folhas de sorgo inoculadas com *C. graminicola* onde foi observado um intenso acúmulo de fitoalexinas (SNYDER e NICHOLSON, 1990). Diante dos resultados encontrados neste trabalho, pode-se sugerir que o clone 626 expressa sua resistência a *C. guaranicola* pelo atraso na entrada do patógeno e colonização dos seus tecidos, o que é uma consequência da baixa quantidade de formação de

apressório, encontrada neste material. Segundo PASCHOLATI e LEITE, (1995), a resistência de uma planta a um patógeno também pode ser definida como a capacidade de o hospedeiro em atrasar ou evitar a entrada e subsequente atividade de um patógeno em seus tecidos. As implicações epidemiológicas deste atraso na colonização e manifestação dos sintomas são desconhecidas para a antracnose do guaranazeiro, sendo necessários estudos adicionais envolvendo outros componentes e resistência, como período latente e severidade, a fim de avaliar o desenvolvimento da doença neste material.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

O agente causal da antracnose do guaranazeiro foi reavaliado quanto a suas características morfológicas, visando esclarecer sua posição taxonômica. O conídio do fungo é hialino, de formato cilíndrico, medindo 10,5-15,5 x 3-4,5  $\mu\text{m}$ . O apressório é globoso e melanizado, medindo 4,5-8 x 5-8,5  $\mu\text{m}$ . O fungo produz micélio abundante em meio de cultura (BDA), e quando esporulando, apresenta uma massa de conídios de cor alaranjada. Estes dados foram comparados com a literatura especializada no gênero *Colletotrichum* (SUTTON, 1980 e SUTTON, 1992) e foi observado que o fungo em estudo não se enquadra em qualquer das espécies deste gênero atualmente aceitas. Diante deste resultado, este estudo confirma a descrição feita por Albuquerque (1961), e reforça o reconhecimento da espécie *Colletotrichum guaranicola*.

A quantificação dos eventos de pré-penetração foi feita a fim de detectar diferenças quantitativas quanto à germinação e à formação de apressório entre os clones e entre folhas de idades diferentes. Foram avaliadas folhas novas e velhas dos clones resistente e suscetível, nos períodos de 6, 12, 24 e 48 horas após a inoculação. As amostras coletadas nestes períodos foram clareadas e coloridas com azul de algodão e observadas ao microscópio de luz. Os dados obtidos revelaram que há diferença quanto à germinação entre os clones e entre folhas novas e velhas no clone suscetível, porém, no clone resistente não há diferença

quanto à germinação entre folhas novas e velhas. A formação de apressório é maior em folhas novas tanto no clone resistente quanto no suscetível. Comparando-se os dois clones, observa-se que a formação de apressório é maior no clone suscetível no período de 24 horas após a inoculação, e esta diferença reflete na penetração e colonização dos tecidos do clone resistente.

O estudo da colonização dos tecidos dos clones foi realizado com amostras coletadas entre 24 horas e sete dias após a inoculação. Estas amostras foram incluídas em resina SPURR, submetidas a cortes semifinos (1  $\mu$  de espessura) e observados ao microscópio de luz. Observou-se que o processo de infecção e colonização dos tecidos é semelhante àquele observado em interações hemibiotróficas. O fungo, após germinar e formar um apressório melanizado, penetra diretamente pela cutícula e parede celular das células da epiderme, por meio de uma hifa de infecção que dá origem a uma vesícula de infecção e em seguida à hifa primária, que coloniza inter e intracelularmente o parênquima. Com o tempo, todas as camadas de células apresentam-se colonizadas, com células disformes. Com a morte destas células, surgem os sintomas necróticos típicos da doença.

Comparando-se os clones resistente e suscetível, observou-se que a colonização dos tecidos ocorre da mesma maneira nos dois materiais, porém, há uma diferença temporal entre eles, sendo que no suscetível com 24 horas após a inoculação é possível observar a colonização das células epidérmicas; no resistente, esta colonização só é vista no terceiro dia após a inoculação. Este atraso na colonização dos tecidos do clone resistente reflete-se na manifestação dos sintomas, que são observados no clone suscetível no quinto dia após a inoculação, enquanto que no resistente os sintomas se manifestam somente no sétimo dia após a inoculação.

A formação de papilas nas células da epiderme foi observada tanto no clone resistente quanto no suscetível, porém, apesar de não ter sido feita uma avaliação quantitativa das papilas nos dois clones, a frequência destas parece não

diferir entre os materiais, sugerindo que as papilas não influenciam no atraso da colonização observada no clone resistente.

Diante dos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que *Colletotrichum guaranicola* trata-se de um táxon distinto dentro do gênero *Colletotrichum*, reafirmando assim o reconhecimento desta espécie, descrita por Albuquerque em 1961. Existe diferença quantitativa entre os clones quanto à formação de apressório, sendo maior no clone suscetível. Os eventos de pré-penetração também apresentam diferença entre folhas e idades diferentes, sendo maior em folhas novas. A resistência do clone 626 se manifesta pelo atraso na penetração e colonização de seus tecidos pelo patógeno, refletindo no aparecimento dos sintomas da doença.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. In: BAILEY, J.A., DEVERALL, B.J. (Eds.). **The dynamics of host defense**. New York: Academic, 1983, p 33-70.
- ALBUQUERQUE, F.C. **Antracnose do guaraná**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Serviço de Informação Agrícola. 1961. 22p.
- 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***. Wallingford, U.K: CAB International, 1992. p88-120.
- BATISTA, M.F. **Doenças do Guaranazeiro**. M.A./EMBRAPA-UEPAE-Manaus. Circular Técnico nº 9. agosto. 1983. 27p.
- BERLYN, G.P., MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Iowa, USA: The Iowa State University, 1976. 326p.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Delegacia Federal de Agricultura do Amazonas. Serviço de Defesa Sanitária Vegetal. **SERDV – Informativo**. Manaus, v.1, n.1, p.5-7, 1984.
- BYRNE, J.M., HAUSBECK, M.K., HAMMERSCHMIDT, R. Conidial germination and appressorium formation of *Colletotrichum coccodes* on tomato foliage. **Plant. Dis.** v.81, n.7, p 715-718, 1997.

- COATES, L.M., MUIRHEAD, I.F., IRWIN, J.A.G., GOWANLOCK, D.H. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. **Mycol. Res.** v. 97, n.11, p.1363 –1370, 1993.
- CORREA, M.P.F., PINTO, A.A., SANTOS, W.C. **Guaraná: resumos informativos**. Brasília: EMBRAPA, 1979. p.22-27.
- DODD, J.C., ESTRADA, A., JEGER, M.J. Epidemiology of *Colletotrichum gloeosporioides* in tropics. In: BAILEY, J.A., JEGER, M.J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford, U.K: CAB International, 1992. p.308-325.
- DUARTE, M.L.R., ALBUQUERQUE, F.C., CORRÊA, M.P.F. Variações morfológicas e fisiológicas em isolamentos de *Colletotrichum guaranicola*. **Fitopatol. bras.** v.20, n.2, p.141- 144,1995.
- EMATER/EMBRAPA. **Sistema de produção para guaraná. (revisão) Estado do Amazonas- Manaus**: EMATER-AM , 1983. p.24-9. (Sistemas de produção, Boletim, 01).
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Curso de Tecnologia do Guaraná**. Ariquemes-RO: 1986. p.93-96.
- EPSTEIN, L., NICHOLSON, R.L. Adhesion of spore and hyphae of plant surfaces. **Plant Relationships**. In: TUDZYNSKI, C. (Ed). Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1997. p.11-25.
- ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T., MAZAU, D., BARTHE, J.P., LAFITTE, C., TOUZÉ, A. Mechanisms of resistance to *Colletotrichum* species. In: BAILEY, R. J., Jeger, M. J. (Eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford, U.K: CAB International 1992. p.121- 133.
- FUNDAÇÃO JOAQUIM NABUCO. **Guaraná, um brinde à saúde** .Manaus: Superintendência Regional da Amazônia; Museu do Homem do Norte, 1984. p.47-53.
- GONÇALVES, J.R.C. **Observações sobre doenças e pragas do guaraná no estado do Amazonas**. Belém: Instituto de Pesquisa e Experimentação Agropecuária do Norte, (IPEAN). 1968. p.3-9.
- GUARANÁ: aspectos agroeconômicos. Região Norte. Belém: **SUDAM**, 1985. p.1-22.

- KOGA, H. BUSHNELL, W.R., ZEYEN, R.J. Specificity of cell type and timing of events associated with papilla formation and the hypersensitive reaction in leaves of *Hordeum vulgare* attacked by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Can. J. Bot.** v. 68, p. 2344-2352, 1990.
- KUBO, Y., FURUSAWA, I. Melanin biosynthesis: Prerequisite for successful invasion of the plant host by appressoria of *Colletotrichum* and *Pyricularia*. In: COLE, G.T., HOCH, H.C. (Eds.). **The fungal spore and disease initiation in plants and animals**. New York: Plenum, 1991. p.205-215.
- LONGO, N., NALDINI, B., DROVANDI, F., GONNELLI, T., TANI, G. Penetration and early colonization in basidiospore-derived infection of *Melampsora pulcherrima* (Bub.) Maire on *Mercurialis annua* L. **Caryologia**, v.47, n.3-4, p.208-222, 1994.
- MATSUOKA, K. **Aspectos ultra-estruturais na interação *Phytophthora capsici* Leonian e *Capsicum annum* L.** Viçosa, MG: UFV, 112p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Viçosa, 1988.
- MENDENGEN, K., DEISING, H. Infection structures of fungal plant pathogens - a cytological and physiological evaluation. **New Phytol.** v.124, n.2, p.193-213, 1993.
- MENDENGEN, K., SCHNEIDER, A., STERK, M., FINK, W. The differentiation of infection structures as a result of recognition events between some biotrophic parasites and the host. **J. Phytopathology**, v.123, p.259-272, 1988.
- 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, n.6, p.407-420, 1994.
- MORIN, L., BERBY, J.L., KOKKO, E.G. Infection process of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* on Malvaceae weeds. **Mycol Res.** v.100, n.2, p.165-172, 1996.
- MOULD, M.J.R., ROBB, J. The *Colletotrichum trifolii* - *Medicago sativa* interface, in culture: a cytological analysis. **Can. J. Bot.** v.70. n.1, p.114-124, 1992.

- MUNAUT, F., MARAITE, H. Conidium germination and appressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guinensis*. **J. Phytopathology** v.146, n.1, p.19-26, 1998.
- NASCIMENTO FILHO, J.F., GARCIA, T.B., ANTÔNIO, I.C. **Importância terapêutica do guaraná**. Manaus: EMBRAPA/CPAA. p.1, 1990. (Informativo EMBRAPA-CPAA)
- NASCIMENTO FILHO, J.F., MOREIRA, M.I.P. **Determinação da idade ideal da folha de guaranazeiro para a inoculação de *Colletotrichum guaranicola***. [Manaus, Embrapa], [199-] (Comunicação pessoal).
- O'CONNELL, R.J., URONU, A.B., WAKSMAN, G., NASH, G., KEON, J.P.R., BAILEY, J.A. Hemibiotrophic infection of *Pisum sativum* by *Colletotrichum truncatum*. **Plant Pathology**, v. 42, n.5, p.774-783, 1993.
- PASCHOLATI, S.F., LEITE, B. Hospedeiro: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A., KIMATI, H., AMORIM, L. (Eds.). **Manual de fitopatologia**, 3.ed. São Paulo: CERES, 1995, v.1, p. 417-453.
- ROCHA, J.R.S., OLIVEIRA, N.T., MENEZES, M. Comparação da eficiência de métodos de inoculação na avaliação da patogenicidade de isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* em frutos de maracujá (*Passiflora edulis*). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.41, n.1, p.145-153, 1998.
- SASS, J.E. **Botanical microtechnique** . 3.ed. Iowa, USA:The Iowa State University, 1958. 228p.
- SCHMIDT, F. **O guaraná, sua cultura e indústria**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/Serviço de Informação agrícola, 29p, 1941.
- SKIPP, R.A., BEEVER, R.E., SHARROCK, K.R., RIKKERINK, H.A., TEMPLETON, D. *Colletotrichum*. In: KOMOTO, K., SINHG, U.S., SINHG, R.P. (Eds.). **Pathogenesis and host especificity in planta disease: histopathological, biochemical, genetic and molecular bases**. New York, USA: Pergamon, 1995. v.2, p.119-136.
- SNYDER, B.A., NICHOLSON, R.L. Synthesis of phytoalexins in Sorghum as a site-specific response to fungal ingress. **Science**. v. 248, p. 1585-1688. 1990.
- SUTTON, B.C. The Genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A., JEGER, M.J. (Eds.). ***Colletotrichum: biology, pathology and control***. Wallingford, U.K: CAB International, 1992. p.1-26.

- SUTTON. B.C. **The Coelomycetes.** Surrey, England: Commonwealth Mycological Institute. 1980. 696p.
- VÉRAS, S.M. **Patogenicidade e características fisio-morfológicas e isoenzimáticas de isolados de *Colletotrichum guaranícola* Albuquerque, agente causal da antracnose do guaranazeiro (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke).** Recife: UFRE, 82p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recife, 1996
- WALLER, J.M. *Colletotrichum* disease of perennial and other cash crops. In: BAILEY, J.A., JEGGER, M.J. (Eds.). ***Colletotrichum: Biology, Pathology and Control.*** Wallingford, U.K: CAB International, p.167-185, 1992.
- WHARTON, P.S., JULIAN, A.M. A cytological study of compatible and incompatible interactions between *Sorghum bicolor* and *Colletotrichum sibirae*. **New Phytol.** v.134, n.1, p.25-34, 1996.
- ZULFIQAR, M., BRLANSKY, R.M., TIMMER, L.W. Infection of flower and vegetative tissues of citrus by *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycologia**, v.88, n.1, p.121-128, 1996.

## **APÊNDICE**

## APÊNDICE

Quadro 1A - Porcentagem de germinação de conídios em clones resistente e suscetível e em folhas novas e velhas, no período de 6 a 48 horas após a inoculação (h.a.i.)

Período (h.a.i.)	Clones											
	368 (Suscetível)						626 (Resistente)					
	FN	DS	X	FV	DS	X	FN	DS	X	FV	DS	X
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	37	8.7	18.7	7.2	31	8.5	42.7	4.5	37.3	10.4	49.8	12.8
24	94.7	4.5	35.7	12.3	65.2	5.0	67	14.5	64.3	9.5	71.2	9.9
48	82.3	13.6	75.7	7.6	79.0	9.1	88.7	10.1	85	7.2	91.5	4.3

FN= folha nova; FV= folha velha; DS = desvio-padrão médio; X= média.

Os valores de FN e FV são média de três repetições.

Quadro 2A - Porcentagem de formação e apressório melanizado em clones resistente e suscetível e em folhas novas e velhas, no período de 6 a 48 horas após a inoculação (h.a.i.)

Período (h.a.i.)	Clones											
	368 (Suscetível)						626 (Resistente)					
	FN	DS	X	FV	DS	X	FN	DS	X	FV	DS	X
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	34.7	11	16.7	9.0	25.7	6.2	40.3	5.7	7.3	2.1	23.0	5.2
24	94.0	4.6	32.3	12.2	63.2	8.3	44.3	11.2	56.3	11.2	42.7	4.0
48	83.0	11.5	75.0	7.2	79.0	2.3	84.3	8.1	66.7	11.0	74.7	8.3

FN = folha nova; FV = folha velha; DS = desvio-padrão médio; X = média.

Os valores de FN e FV são média de três repetições.