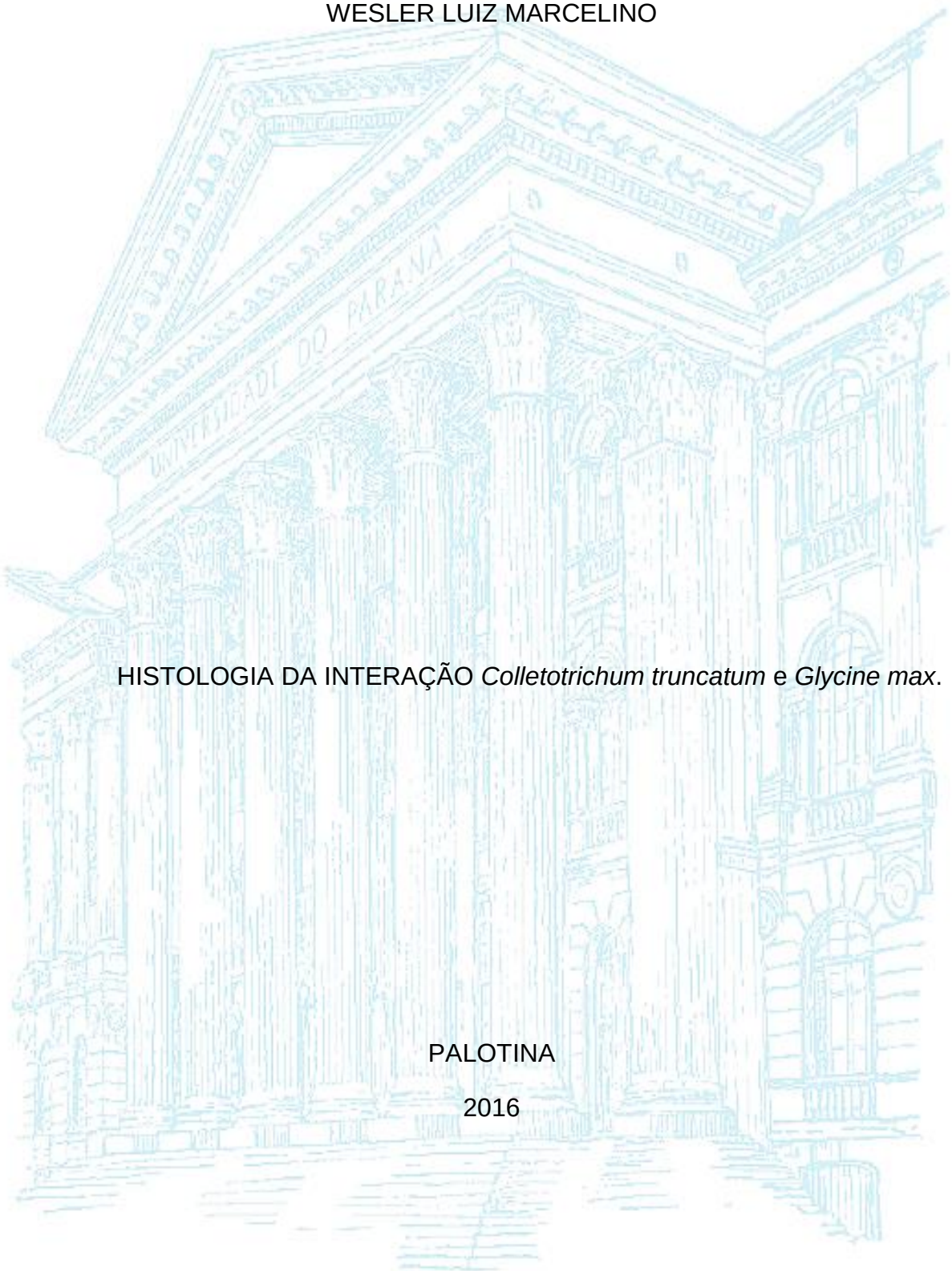
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

WESLER LUIZ MARCELINO



HISTOLOGIA DA INTERAÇÃO *Colletotrichum truncatum* e *Glycine max*.

PALOTINA

2016

WESLER LUIZ MARCELINO

HISTOLOGIA DA INTERAÇÃO *Colletotrichum truncatum* e *Glycine max*.

Trabalho apresentado à disciplina TCC II como requisito de conclusão do curso de Agronomia, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Vivian Carré Missio

PALOTINA

2016

TERMO DE APROVAÇÃO

WESLER LUIZ MARCELINO

HISTOLOGIA DA INTERAÇÃO *Colletotrichum truncatum* e *Glycine max*

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro Agrônomo, Curso Agronomia, Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina. Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Profª. Dra. Vivian Carré Missio.
Orientadora – Departamento de Ciências Agrarias - UFPR Setor Palotina.

Profª. Dra. Luciana Grange – Departamento de Ciências Agrarias - UFPR Setor Palotina.

Prof. Dr. Roberto Luis Portz – Departamento de Ciências Agrarias - UFPR Setor Palotina.

Palotina, 06 de julho de 2016

Aos meus pais Luiz Carlos Marcelino e Valcira Antônia da Silva Marcelino, que foram grandes incentivadores e que sempre acreditaram nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e toda sabedoria, que sempre esteve comigo em todos os momentos, dando força e fortaleza.

Agradeço em especial ao meu Pai Luiz, minha Mãe Valcira e minhas Irmãs, Cryslaine e Gislayne, que sempre foram meu refúgio, meu alicerce e meu porto seguro, agradecendo os puxões de orelha, e todo amor. Obrigado por terem acreditado na minha capacidade de vencer. Agradeço ainda, pela luta constante na vida, pelo esforço econômico e por terem feito o possível e o impossível para me darem a oportunidade de estudar na universidade e em outra cidade. Fico eternamente grato, e compartilho com vocês esta conquista. Amo vocês.

A minha orientadora e amiga Vivian Carré Missio, por toda sabedoria, incentivo, apoio e confiança. Bem como pela paciência nestes anos. Obrigado por todo aprendizado, sou muito grato.

Ao Grupo de estudos em fitopatologia aplicada – GEFIA, onde participei durante 2 anos e tive a oportunidade de demonstrar meu potencial na área, além de, trabalhar e aprender com grandes pesquisadores.

Agradeço a todos os professores que contribuíram para esta conquista, em especial ao professor Roberto Luis Portz e a professora Luciana Grange.

Agradeço ao uma grande amiga Sabrina Holz, por me ajudar durante a realização do trabalho.

Em especial a Vanessa Feitoza de Souza, uma grande amizade, que em todos os momentos esteve me ajudando e me dando forças para continuar.

Aos meus amigos que me incentivaram e me ajudaram, pessoas em que passei 5 anos juntos, que sempre estiveram comigo, nas piores e nas melhores situações: Renata M., Milene, Guilherme, Camila, Renata T., Cintia, Katle, Mirian, Amanda, Alexandre, Marinara e Natália, um muito obrigado por tudo, vocês estão em meu coração

Em especial agradeço minha avó, Florinda, por todo apoio!

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos.

Fernando Pessoa

RESUMO

Estudos relacionados à interação planta-patógeno são importantes ferramentas para o entendimento dos mecanismos de ataque de patógenos e as respostas de defesa das plantas. O patossistema *Colletotrichum truncatum* – *Glycine max*, apesar de ser considerado como uma das principais doenças da cultura na região do cerrado brasileiro, tem sido pouco estudado quanto aos processos da patogênese. O objetivo deste trabalho foi investigar alguns aspectos relacionados à patogênese desta interação, envolvendo pré-penetração e penetração de plantas de soja artificialmente inoculadas com *C. truncatum*. Foram realizados ensaios com dois cultivares de soja, sendo um moderadamente resistente (TMG7062) 4e outro resistente (M5917). Plantas de soja foram inoculadas com uma suspensão de 1,2 x 10^6 esporos mL^{-1} de *C. truncatum* e mantidas em casa-de-vegetação durante a realização dos experimentos. Foram realizados os seguintes ensaios: 1) avaliação do comportamento dos componentes de resistência: período de incubação e latente 2) observação a nível microscópico das fases de adesão e pré-penetração do patógeno, através de microscopia de luz. As coletas de amostras para análises microscópicas serão realizadas aos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias após a inoculação das plantas de soja. Os fragmentos de folhas coletados foram fixados em etanol 70% (v/v) e depois descoloridos em etanol 95% (v/v), para montagem das lâminas e observação. Os resultados mostram um período de incubação para o cultivar resistente de 144 horas, enquanto para o cultivar moderadamente resistente de 120 horas, não sendo observado o período latente, devido talvez pela falta de um ambiente totalmente controlado. O cultivar moderadamente resistente apresentou lesões com 6 dias após a inoculação, enquanto o cultivar resistente somente 7 – 8 dias após a inoculação. Deste modo podemos considerar que o cultivar resistente possui seus mecanismos de defesa mais ativo e eficiente comparado com o cultivar moderadamente resistente.

Palavras-chave: Antracnose, soja, histologia.

ABSTRACT

Studies related to pathogen plants interactions are important tools for the understanding of the pathogen attack mechanisms and plant defense responses. The pathosystem Colletotrichum truncatum – Glycine max, despite being considered one of the major diseases in the brazilian Cerrado region, has just a few studies on the processes of pathogenesis. The aim of this study was to investigate aspects related to the pathogenesis of this interaction, involving pre-penetration and penetration of artificially inoculates soybean plants with C. truncatum. Tests were performed with two soybean cultivars, one being moderately resistant (TMG7062) and the other being resistant (M5917). Soybean plants were inoculated with a suspension of 1.2 x 106 spores ml-1 of C. truncatum and maintained at a greenhouse during the experiments. The following tests were performed: 1) evaluation of the behavior of the resistance components: incubation and latent period 2) microscopic level observation of the adhesion levels and pathogen pre-penetration, through light microscopy. The sample collections for the microscopic analysis will happen at 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 days after the inoculation of the soybean plants. The collected leaves fragments were fixed in ethanol 70% (v/v), for the setting of blades and observation. The results show a period of incubation for the resistant cultivar of 144 hours, while the moderately resistant cultivar was 120 hours, it was not observed the latent period, perhaps due to a lack of a fully controlled environment. The moderately resistant cultivar presented lesions 6 days after inoculation, while the resistant cultivar was 7-8 days after inoculation. Thus, we can consider that the resistant cultivar has its defense mechanisms more efficient and active compared to the moderately resistant cultivar.

Key words: Anthracnose. Soybean, Histology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - FOLHAS DE SOJA: CULTIVAR TMG7062RR (A) E CULTIVAR M5917 (B), AOS 5 E 6 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM C. TRUNCATUM, RESPECTIVAMENTE.. 22

FIGURA 2 - FOLHAS DE SOJA DOS CULTIVARES TMG7062RR (A, C) E M5917 (B, D) COLETADAS 18 E 20 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM C. TRUNCATUM, RESPECTIVAMENTE. 23

FIGURA 3 - ELETROMICROGRAFIAS DE FOLHAS DE PLANTAS DE SOJA DOS CULTIVARES TMG7062RR (A, C E E) E M5917 (B, D E F), AOS 2, 4 E 6 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM C. TRUNCATUM, RESPECTIVAMENTE.....26

FIGURA 4 – MICROGRAFIA DE LUZ DE FOLHAS DE PLANTAS DE SOJA DOS CULTIVARES TMG7062RR (A, C E E) E M5917 (B, D E F), AOS 2, 4 E 6 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM *C. TRUNCATUM*, RESPECTIVAMENTE.....28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CULTIVARES DE SOJA UTILIZADAS NO EXPERIMENTO, AGRUPADAS COM O GRUPO DE MATURAÇÃO CARACTERISTICAS GENÉTOICAS E LOCAL DE INDICAÇÃO. 18

LISTA DE ABREVIATURAS

UFPR – UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BDA – BATATA DEXTROSE ÁGAR

B.O.D - DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO

LISTA DE SIMBOLOS

CM – CENTÍMETROS

MM – MILIMETROS

µM- MICROMETRO

α - ALPHA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO REFERENCIADA 14
2 OBJETIVO 17
2.1 OBJETIVO GERAL 17
3 METODOLOGIA 18
3.1 LOCAL E MATERIAIS 18
3.2 OBTENÇÃO, CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *C. truncatum* 18
3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE INÓCULO 19
3.4 AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DE RESISTÊNCIA DO PATOSSISTEMA 19
3.4.1 Período de incubação (PI) 19
3.4.2 Período latente (PL60) 20
3.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA 20
3.5.1 Microscopia de Luz (ML) 20
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 21
4.1 COMPONENTES DE RESISTÊNCIA AVALIADOS 21
4.1.1 Período de incubação (PI) 21
4.1.2 Período de latência (PL60) 23
4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA 24
4.2.1 Microscopia de luz (ML) 24
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 29
6 REFERÊNCIAS 30

1 INTRODUÇÃO REFERENCIADA

A economia mundial tem por base a utilização de espécies vegetais, sendo de extrema importância o estudo entre as interações de plantas e fungos patogênicos para humanidade, visto que esses fungos causam sérios danos econômicos. A infestação de espécies de fungos patogênicos pode ter como consequência a fome e influências na mudança de costumes de toda uma nação (BARBIERI *et al.*, 2001).

As doenças fúngicas na cultura da soja ocorrem em maiores proporções comparadas com os outros organismos causadores de doenças. A antracnose é um exemplo de doença fúngica, esta por sua vez causa perdas consideráveis em regiões de cultivo de soja em todo mundo, principalmente quando há condições de clima quente e úmido favorecendo o desenvolvimento do patógeno (SANT'ANNA *et al.*, 2010).

O patógeno causador da antracnose da soja foi descrito em julho de 1987, isolado a partir de manchas foliares de *Sesbania exaltata* (Raf.) Cory, e identificado como *Colletotrichum truncatum* (Schw.) Andrus & Moore. A doença era generalizada entre as mudas de *S. exaltata*, afetando principalmente os cotilédones, não sendo encontrados sintomas em mudas mais velhas (BOYETTE, 1991).

A antracnose é caracterizada por apresentar no estádio juvenil da planta, a chamada infecção juvenil, quando o patógeno infecta as plantas e os sintomas só são observados nos estádios mais avançados do seu desenvolvimento (COSTA *et al.*, 2009). Os sintomas são principalmente necrose dos pecíolos, morte da plântula e manchas nas folhas, hastes e vagens. O fungo tem a capacidade de infectar pecíolos, vagens e ramos laterais em qualquer estádio de formação. As vagens quando infectadas nos estádios R3-R4 ficam retorcidas e adquirem coloração castanho-escuro a negra (KIMATI *et al.*, 2005).

A espécie *C. truncatum* produz acérvulos pretos em estromas no tecido infectado. Os acérvulos são cheios de setas escuras. Os conídios unicelulares e hialinos produzidos em conidióforos. A fonte de inóculo do fungo normalmente são sementes infectadas da última safra e restos de cultura. O fungo tem seu desenvolvimento de forma sistêmica no interior do tecido cortical. Quando há baixa fertilidade do solo, principalmente na falta de potássio são registrados maiores danos (KIMATI *et al.*, 2005).

A infecção causada por *C. truncatum* é iniciada pela ligação dos conídios com a parte aérea da soja. Os conídios germinam imediatamente após a adesão e se diferenciam para formar estruturas de infecção, chamada apressório, dedicado à penetração mecânica. Quanto à formação do apressório, é requerida uma síntese de proteína em conjunto com uma precisa regulagem do comportamento nuclear. A síntese de proteína requer o produto melanina (SUZUKI *et al.*, 1981). A melanina possui função crucial no processo de penetração, porem pode proteger o patógeno de irradiações prejudiciais (BARROS, 2008).

Posteriormente a formação do apressório, começa uma infecção fina através do tubo germinativo crescendo entre a parede celular e membrana plasmática das células da planta (BHADAURIA *et al.*, 2011).

Após o desenvolvimento do apressório, germinação dos conídios, rompimento da cutícula e da parede celular do hospedeiro através da hifa de penetração, o fungo caracterizado como “patógeno hemibiotrófico intracelular”, cresce inicialmente pela fase biotrófica sendo caracterizado por hifas primarias volumosas no interior do lúmen das células da epiderme viva. Logo que o crescimento biotrófico foi estabelecido com sucesso, o fungo passa para a fase necrotrófica, com produção de hifas secundárias, matando a célula do hospedeiro (BHADAURIA *et al.*, 2011).

As plantas de soja possuem algumas defesas contra patógenos, elas liberam aldeídos derivados de oxidação lipídica quando seus tecidos são danificados, esses aldeídos voláteis e oxiácidos causam efeito inibitório sobre o crescimento de fungos patogênicos, podendo desempenhar um papel importante na resistência a doenças (GARDNER *et al.*, 1991). Além disso, a parede celular é formada por componentes que protegem a planta, tais como: celulose, hemicelulose, lignina e pectina. A pectina, um heteropolissacarídeo definida como polímeros ricos em ácidos galacturonato, é composto por cadeias de 1-4 α-galacturonato ligadas com alta percentagem de esterificação de metil (RAMOS *et al.*, 2010).

A maioria dos fungos patogênicos, assim como o *C. truncatum* produzem enzimas pectinolíticas, capazes de degradar a pectina e macerar os tecidos vegetais, as quais são as primeiras a serem secretadas ao atacar a célula vegetal. A degradação da pectina pode ser alcançada pela ação combinada de várias enzimas, como a pectina metil-esterases e a pectina depolimerases, incluindo hidrolases e liases, como a polimetil-galacturonase e a pectina liase (RAMOS *et al.*, 2010). O papel

das enzimas degradantes de pectina causando a degradação da parede celular é tão importante que determina a virulência de muitos patógenos.

Em experimento realizado por Costa *et al.* (2006), foi avaliada a resistência de plantas de soja à *C. truncatum* em diferentes estádios fenológicos (V1/V2) – (V5/V6). Os testes foram feitos em 6 cultivares, sendo: “Anta 82” e “MSoy 8400” (resistentes), “BRS 154” e “CD 205” (intermediárias) e “Emgopa 316” e “Tabarana” (suscetíveis). Os resultados mostraram que os cultivares inoculadas em estádios fenológicos mais avançados apresentaram um índice de maior resistência. São poucos os trabalhos relacionados ao estudo dos processos da patogênese deste patossistema. Esse tipo de estudo pode elucidar os principais mecanismos envolvidos no processo de parasitismo de *C. truncatum,* e, desta forma contribuir para o melhoramento de plantas de soja para resistência ao patógeno.

Estudos relacionados aos processos que envolvem a patogênese de fitopatógenos são importantes ferramentas na busca da obtenção de plantas resistentes, pois indicam os principais mecanismos pelos quais os patógenos utilizam para infectar as plantas. Trabalhos que avaliam diretamente a resistência de cultivares são importantes na indicação da presença ou não da resistência, porém não esclarecem quais os mecanismos interrompidos na patogênese.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Elucidar os principais mecanismos envolvidos no processo de parasitismo de *C. truncatum* em plantas de soja, e, desta forma contribuir para o melhoramento da cultura para resistência ao patógeno.

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAL E MATERIAIS

Os ensaios *in vivo* deste trabalho foram conduzidos em casa de vegetação do departamento de ciências agronômicas da Universidade federal do Paraná, UFPR, Palotina, PR, no período de março de 2015 a maio de 2016.

Os cultivares de soja comerciais utilizadas no experimento foram TMG7062 (Intermediária) e M5917 (Resistente) adaptadas à região do Paranaense, totalizando 2 genótipos.

TABELA 1 - CULTIVARES DE SOJA UTILIZADAS NO EXPERIMENTO, AGRUPADAS COM O GRUPO DE MATURAÇÃO CARACTERISTICAS GENÉTOICAS E LOCAL DE INDICAÇÃO.

CARACTERÍSTICAS DOS CULTIVARES			
CULTIVARES	GRUPO DE MATURAÇÃO	RESISTÊNCIA GENÉTICA	INDICAÇÃO
TMG7062RR	6.2	MODERADAMENTE RESISTENTE	GO, MG, MS,MT, PR, PY, RS, SC e SP
M5917	5.9	RESISTENTE	MS, PR e SP

FONTE: O autor (2016).

3.2 OBTENÇÃO, CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *C. truncatum*

C. truncatum foi isolado diretamente a partir de cotilédones da soja com sintomas da doença e sinais do patógeno, provenientes do cultivar M6210. Após a coleta, os cotilédones foram levados a laboratório, onde foi realizado seu isolamento. Para tanto, porções da mucilagem contendo os conídios do fungo foram transferidas com auxílio de uma agulha esterilizada para o meio de cultura. O fungo foi cultivado em meio de BDA (batata 20% + dextrose 2% + ágar 1,8% + 1000 mL de água destilada) sob regime luminoso de 12/12 luz/escuro e temperatura 23ºC, até a formação de colônias do fungo.

Após as colônias apresentarem crescimento de 2 cm na placa de Petri, o fungo foi repicado para o meio de cultura Mathur (2,8g de dextrose + 1,23g de $MgSO_4.7H_2O$ + 20g de ágar + 2g de neopeptona + 2,72g de KH_2PO_4 + 1000 mL de água destilada) descrito por Dhingra e Sinclair (1994), para induzir a esporulação.

Após a repicagem para o meio Mathur, as placas com o fungo foram incubadas em condições de fotoperíodo 12/12h (luz/escuro) e temperatura de 23ºC, respectivamente, até ter sido obtida esporulação abundante do isolado

3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO DE INÓCULO

Após 15 dias de crescimento em câmara B.O.D., foi acrescentado uma mistura de água mais o espalhante *Tween* 80, na concentração de 0,5% (0,5mL de *Tween* 80 + água destilada estéril 100 mL.) na placa de Petri com crescimento fúngico, para facilitar a liberação dos esporos. A mistura foi agitada vigorosamente, para retirada dos esporos, e após, filtrada para retirada de impurezas. No líquido resultante (suspensão de esporos), foi ajustada a concentração do inóculo ($2,0 \times 10^6$ esporos de *C. truncatum* mL^{-1}) com auxílio de um hemacitômetro (Câmara de Neubauer)

Para aumentar a aderência dos conídios sobre o tecido da planta, foi adicionada 0,5% p:v de gelatina incolor e sem sabor na suspensão de conídios. As inoculações foram realizadas com uma suspensão de $1,2 \times 10^6$ esporos de *C. truncatum* mL^{-1}, com auxílio de um atomizador manual. Após 48h em câmara úmida (UR > 95%, 23-25ºC), as plantas foram transferidas para casa de vegetação e distribuídas completamente ao acaso, sob condições naturais de luminosidade.

3.4 AVALIAÇÃO DE COMPONENTES DE RESISTÊNCIA DO PATOSSISTEMA

Foram avaliados os seguintes componentes de resistência:

3.4.1 Período de incubação (PI)

Período, em horas, compreendido entre a inoculação das plantas e o surgimento dos primeiros sintomas. As avaliações foram iniciadas dois dias após a inoculação das plantas e foram repetidas a cada 24h, até o surgimento de lesões em todos os tratamentos. O monitoramento foi realizado em duas folhas de cada planta inoculada. Foi utilizada uma lupa (aumento de 3,5x) para observar as lesões e um paquímetro eletrônico para medir as mesmas.

3.4.2 Período latente (PL60)

Tempo em dias, desde a inoculação até a esporulação de 60% das lesões presentes nas folhas inoculadas. As manchas foliares foram avaliadas diariamente até que 60% das lesões em duas folhas selecionadas por planta apresentaram acérvulos/conídios do patógeno. Foi utilizada uma lupa (aumento de 3,5x) para observar as lesões esporulantes.

3.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

As coletas de amostras para análises microscópicas foram realizadas aos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias após a inoculação das plantas. Para cada época foram coletadas duas folhas de cada tratamento.

3.5.1 Microscopia de Luz (ML)

Pedaços de folha de soja (40 mm^2) foram retirados das folhas coletadas ao acaso de cada tratamento. Os pedaços de folhas foram fixados em etanol 70% (v/v) e depois descoloridos em etanol 95% (v/v) aquecido por 15 min, e então foram montados em lâminas de vidro contendo algumas gotas de uma solução de glicerina + água (75/25%, respectivamente; v/v) em ácido lático (1,5%), foi utilizado azul de algodão para corar os conídios e hifas. Conídios germinados foram selecionados em cada repetição por tratamento. Foram avaliadas as células necróticas por sítio de infecção e a intensidade da necrose que foi classificada em classe 1: parede celular das células da epiderme com coloração normal; classe 2: parede celular das células da epiderme com coloração marrom claro e classe 3: células com intensa necrose (marrom-escuro), parede celular das células adjacentes com coloração marrom claro.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COMPONENTES DE RESISTÊNCIA AVALIADOS

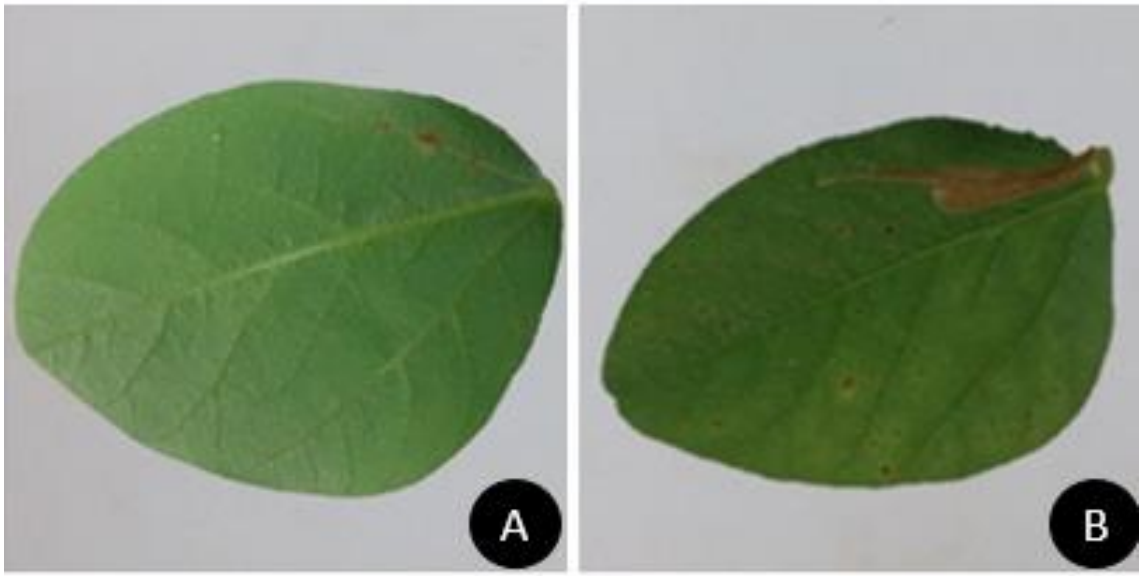
4.1.1 Período de incubação (PI)

O período de incubação (PI) do cultivar moderadamente resistente (TMG7062RR) foi de aproximadamente 120h após a inoculação, enquanto para o cultivar resistente (M5917) o período de incubação foi de 144h após a inoculação. A (FIGURA 1 A), ilustra os sintomas no cultivar moderadamente resistente, onde estão localizados nas nervuras secundárias, com aproximadamente 2,8 mm de comprimento, já a (FIGURA 1 B), ilustra o cultivar resistente, com sintomas entre as nervuras secundárias, com lesões em formato irregulares, medindo aproximadamente 0,8 mm de comprimento.

Os pesquisadores Sharma e Kaushal (2000), em seus experimentos observaram um período de incubação do patossitema *Colletotrichum truncatum* e *Vigna mungo* (L)., de aproximadamente 96 horas após a inoculação.

No patossistema *C. truncatum* e *Lens culinaris* (Lentilha) o parasitismo biotrófico dura cerca de 3 - 4 dias após a infecção, e o parasitismo necrotrófico, inicia-se entre 48 a 72 horas após a inoculação dependendo das condições ambientais, onde resulta em aparecimentos de sintomas com 5 - 6 dias após a infecção (CHEN, et al. 2009; MÜNCH et al., 2008). Além disso, em lentilhas (*Lens culinarias* Medik), *C. truncatum* comporta-se como hemibiotrófico intracelular (CHONGO et al., 2002), enquanto em soja, hemibiotrófico subcuticular, ou seja, o fungo cresce sob a cutícula e na parede das células epidérmicas e subjacentes (MANANDHAR et al., 1985; PERES et al., 2005).

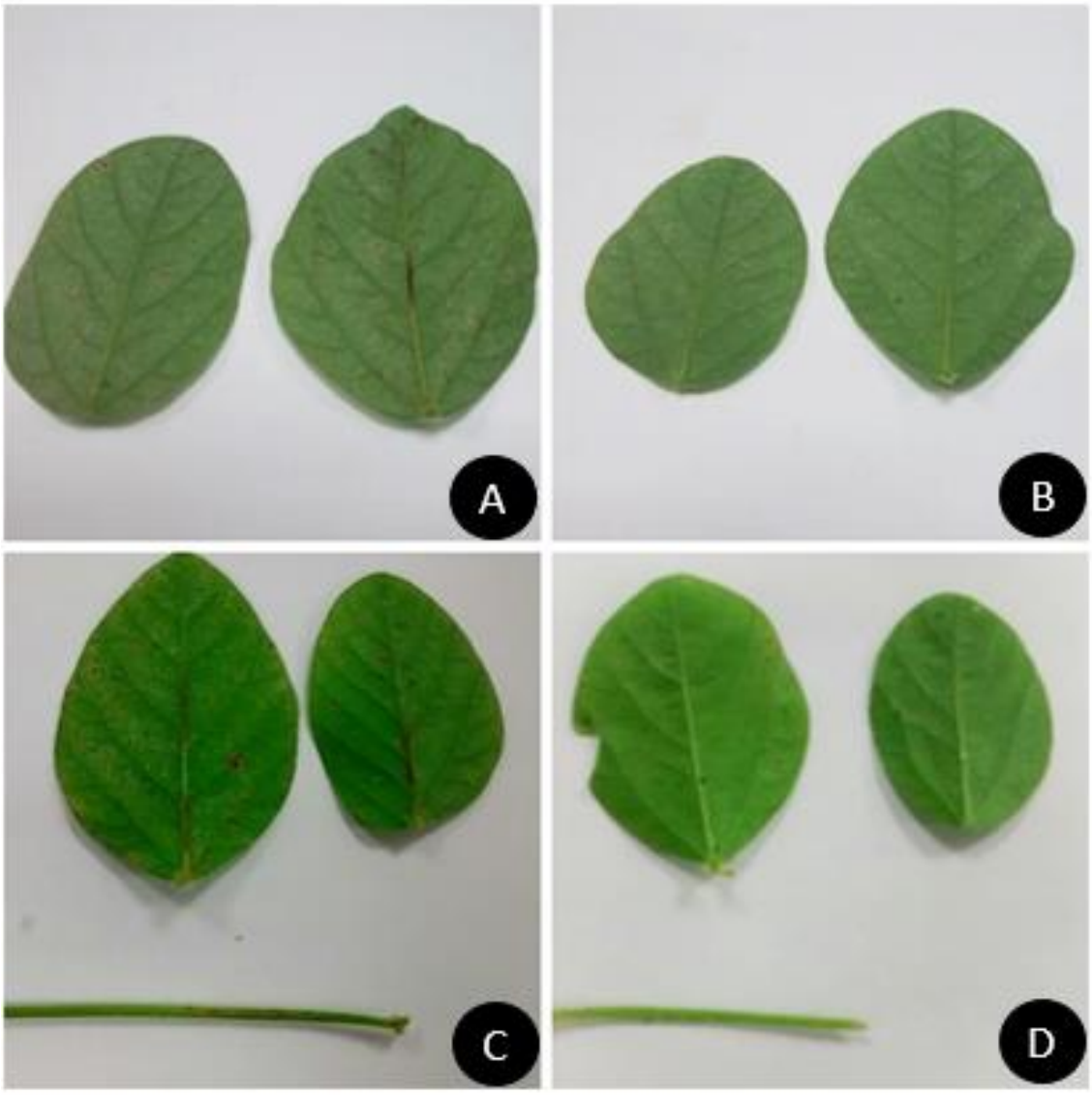
FIGURA 1 - FOLHAS DE SOJA: CULTIVAR TMG7062RR (A) E CULTIVAR M5917 (B), AOS 5 E 6 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM C. TRUNCATUM, RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O autor (2016).

Na Figura 2 são apresentados os trifólios com maior severidade da doença, os quais foram coletados ao acaso aos 18 e 20 dias após a inoculação. As (FIGURAS 2 A e 2C) representa o cultivar TMG7062RR, que apresenta reação moderadamente resistente a *C. truncatum*, onde os sintomas estão localizados em sua maioria sobre as nervuras, apresentando lesões de coloração avermelhada. O folíolo principal do trifólio apresentou lesões com tamanho médio de 5,7 mm, além disso, são observados locais isolados com pequenos sintomas em formato irregular (FIGURA 2C). Na (FIGURA 2 A), são observados sintomas com lesões que medem em média 4 mm, não sendo observados sintomas fora da nervura principal. As (FIGURAS 2 B e 2 D) representam o cultivar resistente, onde os trifólios foram coletados ao acaso e não foram observados sintomas a olho nu.

FIGURA 2 - FOLHAS DE SOJA DOS CULTIVARES TMG7062RR (A, C) E M5917 (B, D) COLETADAS 18 E 20 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM C. TRUNCATUM, RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O autor (2016).

4.1.2 Período de latência (PL60)

O período de latência (PL) não foi observado durante os 20 dias após a inoculação das plantas selecionadas, talvez por não ser um ambiente totalmente controlado, ou mesmo, pelo período de latência ter sido ampliado no cultivar moderadamente resistente e no resistente não possibilitar a formação de estruturas reprodutivas, sendo então uma forma de resistência, a planta permite a infecção do patógeno, porém com alguns mecanismos de defesa que impede a produção de sinais. Alguns autores observaram um período de latência de 13 dias para o patossistema *C. truncatum* e *Lens culinaris* (Lentilha) (CHONGO e BERNIER, 2000).

4.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.2.1 Microscopia de luz (ML)

Na (FIGURA 3) é apresentado o processo de pre-penetração, representado pelo desenvolvimento do tubo germinativo do patógeno e o início das primeiras lesões.

A partir da formação de um septo inicia-se a germinação dos conídios de *C. truncatum*, precedida por uma mitose (SKOROPAD, 1967; STAPLES et al., 1976). Em seguida, através do tubo germinativo o núcleo move-se, onde acontece uma segunda mitose e um segundo septo é formado. A partir disso a célula da ponta do tubo germinativo se desenvolve em um segmento de hifa afim de formar o apressório. Os apressórios têm como funções a adesão, penetração, sobrevivência e atuam como sítios de atividade química (AMORIM, 1995). Posteriormente é formada a hifa infectiva, através de uma mitose que tem como produto final um apressório binucleado maduro (LINS et al., 2007).

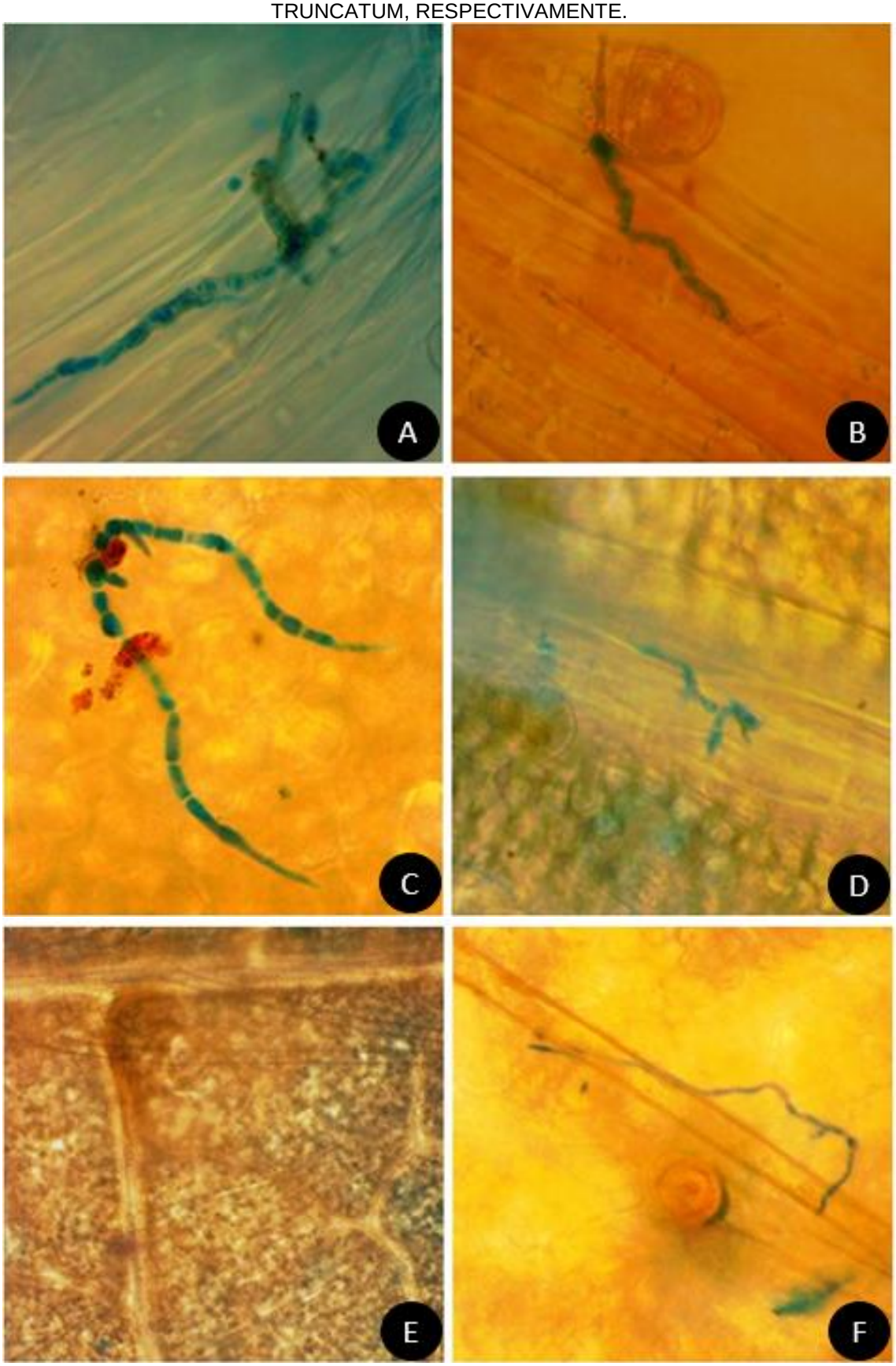
As (FIGURAS 3 A e 3 B), representam os cultivares TMG7062RR e M5917, respectivamente, onde é apresentado o desenvolvimento dos tubos germinativos com 2 dias após a inoculação, sendo agrupada na classe 1, com parede celular das células da epiderme com coloração normal. Pode-se observar que o tubo germinativo do cultivar moderadamente resistente obteve um melhor desenvolvimento comparado com o cultivar resistente. Através de medições realizadas, observou-se que o tubo germinativo do cultivar moderadamente resistente apresentou em média 98,37 µm, enquanto o resistente apresentou um desenvolvimento 73,49 µm. Além disso foi observado em ambos os cultivares a presença de apressórios logo nos 2 primeiros dias, assim as hifas primárias crescem dentro da célula dos cultivares, emitindo posterior as hifas secundárias colonizando e matando as células. Como o cultivar moderadamente resistente apresentou um período de incubação menor, pode-se explicar que os mecanismos físicos e/ou químicos de defesa são menos desenvolvidos comparado com o cultivar resistente.

Nas (FIGURAS 3 C e 3 D), estão representados os cultivares moderadamente resistente e resistente, respectivamente, os quais foram agrupados na classe 1, apresentando apenas o desenvolvimento biotrófico, sem danificar a célula.

A infecção ocorreu em sua maioria diretamente, ou seja, através do rompimento da parede celular. Os experimentos realizados por Manandhar (1995), sobre a penetração e infecção de plantas de soja com *C. truncatum*, mostram que o principal meio de infeção do patógeno é através do rompimento da parede celular, o que corrobora com o que foi observado neste trabalho. Em trabalhos realizados por Ferreira *et al* (2009) sobre o patossistema *C. gloesporioides e Coffea arábica* (L). foi observado a penetração, em sua maior parte, por via direta e raramente pelos estômatos

Na (FIGURA 3 E), pode-se observar células necróticas no cultivar intermediária aos 6 dias após a inoculação do patógeno. É observado um grande número de células necrosadas, sendo agrupadas na classe 2, com parede celular das células da epiderme com coloração marrom claro, confirmando a observação do período de incubação de 120h (5 dias). Já na (FIGURA 3 F), observa-se que ainda está ocorrendo o processo inicial da infecção do cultivar resistente, sendo as células agrupadas na classe 1.

FIGURA 3 - ELETROMICROGRAFIAS DE FOLHAS DE PLANTAS DE SOJA DOS CULTIVARES TMG7062RR (A, C E E) E M5917 (B, D E F), AOS 2, 4 E 6 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM C. TRUNCATUM, RESPECTIVAMENTE.



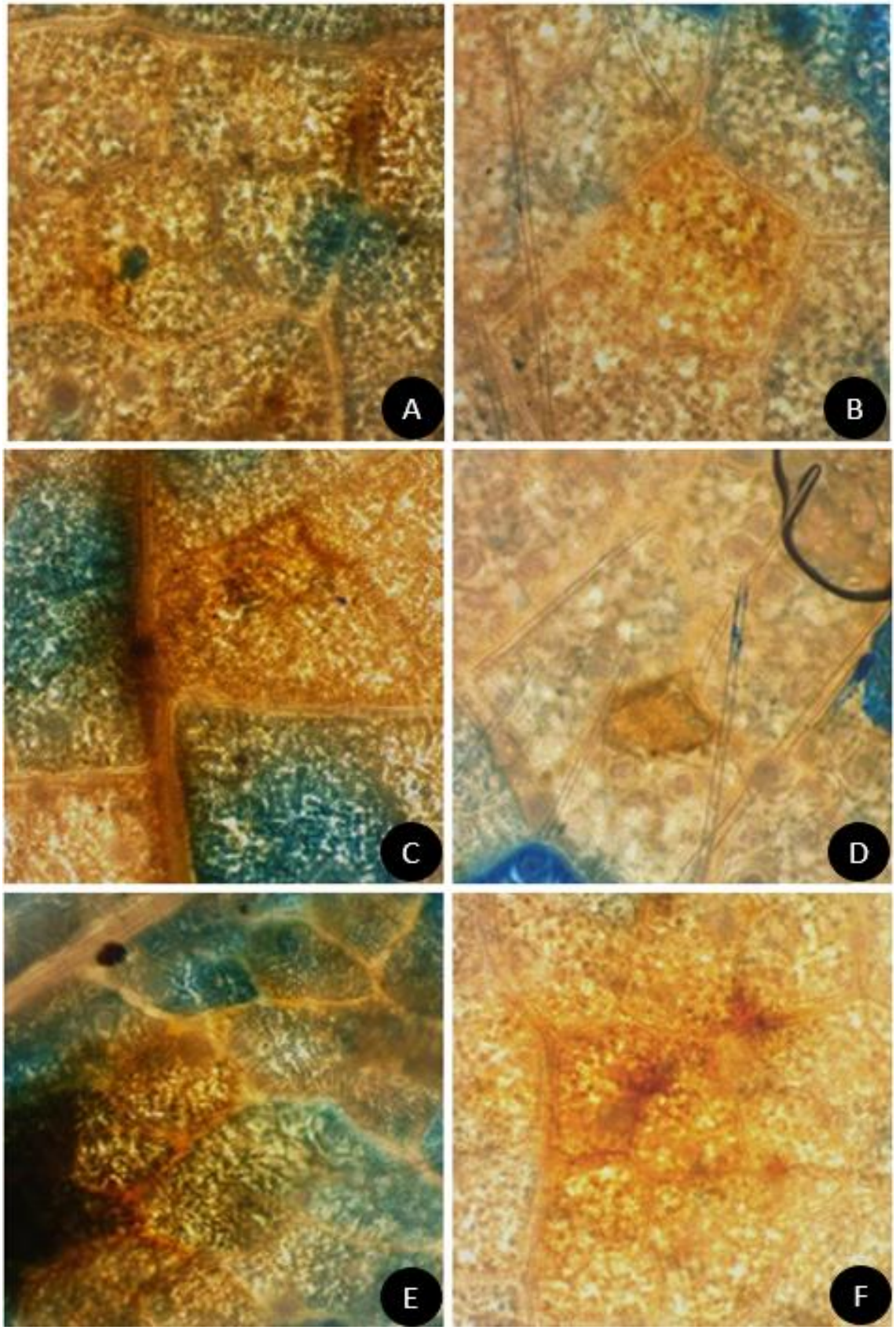
FONTE: O autor (2016).

Na Figura abaixo é apresentado a intensidade das necrose. A (FIGURA 4 A), corresponde o cultivar moderadamente resistente, com 10 dias após a inoculação, onde a intensidade da necrose corresponde a classe 3, com células marrom-escuro, apresentando intensas necroses, isso explica o sucesso da patogenicidade neste cultivar. Já na (FIGURA 4 B), é apresentado o desenvolvimento do cultivar resistente, com 10 dias após a inoculação, sendo as células agrupadas na classe 2.

Na (FIGURA 4 C), as micrografias de luz apresentam células agrupadas na classe 3, as quais correspondem ao cultivar moderadamente resistente, apresentando um grande número de células necrosadas, aos 16 dias após a inoculação com o patógeno, diferente do que é observado na (FIGURA 4 D), em que estão agrupadas células na classe 2, que corresponde ao cultivar resistente, com uma pequena lesão, também aos 16 dias após a inoculação. A intensidade das lesões pode ser explicada segundo Chandrasekaran *et al*. (2000), onde os cultivares resistentes e suscetíveis de soja a *C. truncatum* apresentam diferenças entre suas concentrações de enzimas oxidantes e fenóis.

A necrose causada por *C. truncatum* em folhas de soja foi classificada na classe 3 em ambos os cultivares aos 20 dias após a inoculação (FIGURA 4 F). Nesta data foram então observadas células necrosadas de coloração marrom-escuro, porém com menor intensidade quando comparada com o cultivar moderadamente resistente (FIGURA 4 E).

FIGURA 4 – MICROGRAFIA DE LUZ DE FOLHAS DE PLANTAS DE SOJA DOS CULTIVARES TMG7062RR (A, C E E) E M5917 (B, D E F), AOS 2, 4 E 6 DIAS APÓS A INOCULAÇÃO COM *C. TRUNCATUM*, RESPECTIVAMENTE.



FONTE: O autor (2016).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através dos estudos pode-se observar que o cultivar resistente possui resposta de defesas ativadas durante o processo de pré-penetração.

A resposta de defesa foi observada através da microscopia e da análise visual de resistência, podendo afirmar que o cultivar determinado resistente apresenta mecanismos de resistência ativados de forma mais rápida e efetiva quando comparado com o cultivar moderadamente resistente.

Estudos mais avançados devem ser realizados para analisar quais são os mecanismos que estão associados a resposta de defesa de plantas de soja a antracnose.

6 REFERÊNCIAS

AMORIM, L. Colonização e reprodução. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos.** 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 16, p. 309-324.

BARBIERI, R. L., CARVALHO, F. I. F. Coevolução de plantas e fungos patogênicos. **Rev. Bras. de Agrociência**, Pelotas, v. 7, n. 2, p. 79-83, mai/ago. 2001.

BARROS, G. E. G. **Avaliação da resistência de genótipos de soja a *Colletotrichum truncatum* e estudo da diversidade genética de isolados utilizando a técnica molecular RAPD**. 63 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de Rio Verde – GO, 2008.

BHADAURIA, V. *et al*. Cataloging proteins putatively secreted during the biotrophy-necrotrophy transition of the anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*. **Plant Signal Behav**, v. 6, n. 10, p. 1457–1459, oct, 2011.

BOYETTE, C. D. Host Range and Virulence of *Colletotrichum truncatum*, a Potential Mycoherbicide for Hemp Sesbania (*Sesbaniaexaltata*). **Plant Disease**, Stoneville, v. 75, n. 1, p. 62 – 64, 1991.

CHANDRASEKARAN A, NASASIMHAN V, PAJAPPAN K. Integrated management of anthracnose and pod blight of soybean. **Annals of Plant Protection.** Science v.8: p.163-165, 2000.

CHONGO, G., BERNIER, C.C. Effects of host, inoculum concentration, wetness duration, growth stage and temperature on anthracnose in lentil. **Plant Disease** v. 84, p.544–548, 2000.

CHONGO, G.; GOSSEN, B.D.; BERNIER, C.C. Infection by Colletotrichum truncatum in resistant and susceptible lentil genotypes. **Canadian Journal Plant Pathology**, v.24, p.81-85, 2002.

COSTA, I. F. D. *et al*. Resistência de seis cultivares de soja ao *Colletotrichum truncatum* (Schwein) em dois estádios fenológicos; a et al. **Ciência Rural**, v.36, n.6, nov-dez, 2006

COSTA, I. F. D. *et al*. Reação de germoplasma comercial de soja a *Colletotrichum truncatum*; **Tropical Plant Pathology**, Santa Maria, v. 34, n. 1, p. 47-50 jan./fev 2009. Disponível em: < http://www.scielo.br/pdf/tpp/v34n1/a09v34n1.pdf>. Acesso em 18 de junho de 2015.

ERSHINE, W. *et al*. The lentil/ Botany, production and uses. In: CHEN. W. *et al*. Diseases na their management. 2009. P. 262 – 281.

FERREIRA, J. B. *et al.* Eventos do processo de infecção de Colletotrichum gloeosporioides inoculados em folhas de Coffea arabica L. *Summa Phytopathologica*, v.35, n.4, p.273-281, 2009

GARDNER, H. W., WEISLEDER, D., PLATTNER, R.D. Hydroperoxidelyase and other hydroperoxide-metabolizing activity in tissues of soybean, Glycine max. **Plant Physiol**. v. 97, n. 3, p. 1059 - 1072. 1991.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J.A.M.; BERGAMIN FILHO, A. & CAMARGO, L.E.A. ed. **Manual de Fitopatologia.** Volume 2. Doenças das Plantas Cultivadas. 4ª Edição. Editora Agronômica Ceres Ltda. São Paulo. 666p. 2005.

LINS, S. R. O.; ALVES,E.; ABREU, M. S. Estudos histopatológicos de Colletotrichum spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, p. 488-495, 2007.
atologia Brasileira, v. 32, p. 488-495, 2007.

MANANDHAR, J.B., *et al*. Penetration and infection of soybean leaf tissues by Colletotrichum truncatum and Glomerella glycines. **Phytopathology.** v. 75, p. 704–708. 1985

MÜNCH, S.; LINGNER, U.; FLOSS, D.S.; LUDWIG, N.; SAUER, N.; DEISING, H.B. The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. **Journal of Plant Physiology**, v. 165, p. 41-51, 2008.

CHONGO, G.; GOSSEN, B.D.; BERNIER, C.C. Infection by Colletotrichum truncatum in resistant and susceptible lentil genotypes. Canadian Journal Plant Pathology, v.24, p.81-85, 2002.

RAMOS, A. M., GALLY, M., GARCÍA, C. G., LEVIN, L.; Pectinolytic enzyme production by Colletotrichum truncatum, causal agent of soybean anthracnose; **Rev Iberoam Micol**.; v. 27, n. 4, p. 186–190, oct – dec. 2010.

SANT'ANNA, J. R. *et al*. Genetic relatedness of Brazilian Colletotrichum truncatum isolates assessed by vegetative compatibility groups and RAPD analysis. **Biol. Res**. Santiago, v. 43, n.1, p. 51-62, may, 2010.

SHARMA, R. KAUSHAL, R.P. Identification of urdbean genotypes with horizontal resistance to Colletotrichum truncatum a leaf spot pathogen. Indian Phytopath. **Indian Phytopath**. Palampur, v. 53 n.2, p. 202-205, 2000.

SKOROPAD, W.P. Effect of temperature on the ability of Colletotrichum graminicola to form appresoria and penetrate barley leaves. **Canadian Journal of Plant Science** v.47: p.431-434. 1967.

STAPLES, R.C., LACCETTI, L. & YANIV, Z. Appresorium formation and nuclear division in Colletotrichum truncatum. **Archives of Microbiology** v.109: p.75-84. 1976.

SUZUKI, K. *et al*. Protein Synthesis During Germination and Apressorium Formation of *Colletotrichu lagenarium* spores. **Journal of General Microbiology**, Japan v.124, n. 1, p. 61-69, may. 1981.