

Research, Society and Development, v. 9, n. 11, e78491110211, 2020
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10211>

**Citologia comparativa do processo de infecção do conídio falcado e oval de
Colletotrichum sublineola em cultivar de sorgo suscetível e resistente**
**Comparative cytology of the infection process of *Colletotrichum sublineola* falcate and
oval conidia in susceptible and resistant sorghum cultivars**
**Citología comparativa del proceso de infección de los conidios falcatos y ovalados de
Colletotrichum sublineola en cultivares de sorgo susceptibles y resistentes**

Recebido: 13/11/2020 | Revisado: 22/11/2020 | Aceito: 30/11/2020 | Publicado: 03/12/2020

Edneia Aparecida de Souza-Paccola

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3182-3224>

Universidade Cesumar, Brasil

E-mail: edneia.paccola@unicesumar.edu.br

Isadora Fernanda Sperandio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9287-6576>

Universidade Cesumar, Brasil

E-mail: isadora.sperandio@hotmail.com

Walter Fernandes Meirelles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3078-987X>

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Milho e Sorgo, Brasil

E-mail: walter.meirelles@embrapa.br

Giani Andrea Linde

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1220-2032>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: gianilinde@prof.unipar.br

Nelson Barros Colauto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4390-8302>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: nbc@prof.unipar.br

Luzia Doretto Paccola-Meirelles

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6090-2872>

Universidade Paranaense, Brasil

E-mail: luziadoretto@prof.unipar.br

Resumo

O modo de infecção primária de *Colletotrichum sublineola*, agente causal da antracnose em sorgo, ocorre através de conídios falcados produzidos terminalmente em conidióforos nos acérvulos. Um tipo secundário de conídio, o conídio oval, de menor tamanho e ontogenia distinta dos falcados é também produzido por este patógeno. O objetivo deste estudo foi comparar, por meio de microscopia de luz, o processo de infecção entre estes dois tipos de conídios, os ovais e falcados de *C. sublineola*, em cultivares de sorgo resistente e suscetível à antracnose. Folhas destacadas de 25 dias de idade da BR009 (suscetível) e SC283 (resistente) foram inoculadas com ambos os conídios do isolado patogênico 204.01 e o processo de infecção foi acompanhado por microscopia ótica de 2 a 168 h após a inoculação (AI). Ambos os conídios germinaram 2 h AI e transcorridas 4 h AI, independentemente da cultivar, apressórios arredondados com superfície lisa foram formados diretamente dos conídios falcados, enquanto que apressórios ligeiramente irregulares foram formados na ponta dos tubos germinativos emitidos pelos conídios ovais. Na cultivar suscetível, os apressórios foram formados em maior frequência pelos conídios falcados, enquanto que na cultivar resistente estas estruturas foram formadas em maior frequência pelos conídios ovais. Poros de penetração e hifas de infecção foram visualizados em todos os materiais inoculados com ambos os conídios. Sintomas da doença foram visualizados primeiramente no material inoculado com conídios falcados e foi superior na cultivar suscetível. Lesões com acérvulos contendo conídios falcados foram visualizadas em todos os tratamentos fechando assim o ciclo de infecção.

Palavras-chave: Conídios ovais; Conídios falcados; Dimorfismo conidial; *Sorghum bicolor*; Interação patógeno-hospedeiro.

Abstract

The primary infection mode of *Colletotrichum sublineola*, the causal agent of anthracnose in sorghum, occurs through falcate conidia produced blastically from conidiophores in acervuli. A secondary type of conidium, the oval conidium, smaller in size and distinct ontogeny from the falcate ones, is also produced by this pathogen. The objective of this study was to compare, by light microscopy, the infection process between both conidia, the ovals and falcados conidia from *C. sublineola*, in resistant and susceptible sorghum cultivars to anthracnose. Leaves of sorghum plants with 25 days old from BR009 (susceptible) and SC283 (resistant) cultivars were detached and inoculated with both conidia obtained from 204.01 pathogenic isolate and the process of infection was observed by optical microscopy between 2

to 168 hours after inoculation (AI). Both conidia germinated 2 hours AI and, regardless of the cultivar, after 4 hours AI, rounded appressoria with smooth surface were formed directly from the falcate conidium, while slightly irregular appressoria were formed at the tip of the germinative tubes emitted by the oval conidia. At the susceptible cultivar, appressoria were formed with higher frequency by falcate conidia, while at the resistant cultivar these structures were formed with higher frequency by the oval conidia. Penetration pores and infection hyphae were observed in all the inoculated materials with both conidia. Disease symptoms were observed first on the inoculated material with falcate conidia and mainly on the susceptible cultivar. Lesions with acervuli containing falcate conidia were found at all treatments, thus completing the infection cycle.

Keywords: Oval conidia; Falcate conidia; Conidial dimorphism; *Sorghum bicolor*; Pathogen-host interaction.

Resumen

El modo principal de infección de *Colletotrichum sublineola*, el agente causal de la antracnosis en el sorgo, ocurre a través de conidios falcados producidos terminalmente en conidióforos en los acérvulos. Este patógeno también produce un tipo secundario de conidio, el conidio ovalado, de menor tamaño y ontogenia distinta de los falcados. El objetivo de este estudio fue comparar, mediante microscopía óptica, el proceso de infección entre estos dos tipos de conidios, los óvalos y falcados de *C. sublineola*, en cultivares de sorgo resistente y susceptible. Se inocularon hojas desprendidas de 25 días de edad del cultivar BR009 (susceptible) y SC283 (resistente) con ambos conidios del aislado patogénico 204.01 y el proceso de infección se acompañó por microscopía óptica de 2 a 168 h después de la inoculación (DI). Ambos tipos de conidios germinaron 2 h DI y, independientemente del cultivar, después de 4 h DI se formaron apresorios redondeados con superficie lisa directamente de los conidios falcados, mientras que se formaron apresorios levemente irregulares en la punta de los tubos germinativos emitidos por los conidios ovalados. En el cultivar susceptible, los apresorios fueron formados con mayor frecuencia por los conidios falcados, mientras que en el cultivar resistente estas estructuras fueron formadas con mayor frecuencia por los conidios ovalados. Se visualizaron los poros de penetración y las hifas de infección en todos los materiales inoculados con ambos tipos de conidios. Los primeros síntomas de la enfermedad se observaron en el material inoculado con conidios falcados y fueron superiores en el cultivar susceptible. En todos los tratamientos se observaron lesiones con acérvulos que contenían conidios falcados, cerrando así el ciclo de infección.

Palabras clave: Conídios ovalados; Conídios falcados; Dimorfismo conidial; *Sorghum bicolor*; Interacción patógeno-hospedero.

1. Introdução

A antracnose causada pelo *Colletotrichum sublineola* P. Henn. ex Sacc. & Trotter, 1913 (<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/ec2a7cf4431d1ac586bc85776574aa79>) é considerada uma das mais importantes doenças do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) (Prom et al., 2009; Santos et al., 2014) e tem sido observada em todas as regiões produtoras deste cereal no mundo (Thakur & Mathur, 2000). O patógeno é capaz de infectar todas as partes aéreas da planta (folhas, colmos e panículas) (Silva et al., 2014), sendo a antracnose foliar a forma mais comum e mais severa da doença (da Costa et al., 2013). A antracnose nas folhas do sorgo pode reduzir em 35% a 86% a produtividade de grãos e de folhagem dependendo do grau de severidade e da suscetibilidade do cultivar (Cota et al., 2017).

Vários métodos têm sido propostos para o controle da doença (Thakur & Mathur, 2000) entre eles o mais eficiente tem sido o uso de genótipos resistentes (Casela et al., 1998; Chala et al., 2010; Stutts & Vermerris, 2020). No entanto, devido à alta variabilidade patogênica e à ocorrência de elevado número de raças na população de *C. sublineola* (Casela et al., 1998, 2000; Pande et al., 1991; Silva et al., 2008), as quebras de resistência são frequentes levando ao desenvolvimento constante de novas fontes de resistência para um controle mais eficiente da doença. Esta alta variabilidade em *C. sublineola* tem sido atribuída a mecanismos como heterocariose, recombinação genética e elementos genéticos transponíveis (da Silva et al., 2020). Recombinantes com alta patogenicidade foram isolados diretamente de heterocários formados pelo cruzamento parassexual entre duas linhagens de baixa patogenicidade (Souza-Paccola et al., 2003b), indicando que este pode ser um mecanismo que contribui para gerar variabilidade genética e novas raças fisiológicas. No entanto, este ciclo parassexual não tem sido observado na natureza. Os elementos genéticos transponíveis e as mutações de ponto, como promotores de instabilidade e variabilidade genética, têm sido descritos para o gênero *Colletotrichum* (Santos et al., 2012; da Silva et al., 2020), incluindo *C. sublineola* (Favaro et al., 2007).

Colletotrichum sublineola é um patógeno hemiotrófico intracelular que apresenta inicialmente uma fase biotrófica assintomática seguida de uma fase necrotrófica, quando os sintomas se manifestam (Wharton et al., 2001; Mendgen & Hahn, 2002). Em folhas do sorgo,

estes sintomas são frequentemente observados 40 dias após a emergência das plântulas, embora possam ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (Prom et al., 2009). Sintomas típicos da doença se caracterizam pelo aparecimento de lesões com margens de coloração avermelhada, amarelada, preta ou castanha, dependendo da cultivar. Em ataques mais severos da doença, as lesões podem coalescer causando seca completa da folha. Acérvulos erumpentes (corpos de frutificação assexuados), de coloração escura com setas negras, longas, septadas e não ramificadas podem ser observados no centro das lesões. Conídios falciformes, conhecidos como conídios falcados, emergem das extremidades dos conidióforos que ficam dispostos entre as setas e imersos em uma massa gelatinosa (Casela et al., 1998).

Wharton & Julian (1996) acompanharam o processo de infecção de conídios falcados de *C. sublineola* em cultivares suscetíveis e resistentes de sorgo, demonstrando a importância da fase biotrófica para desenvolvimento da doença e a resposta do hospedeiro para impedir a colonização do fungo. Os autores sugeriram que o processo de compatibilidade ou incompatibilidade no patossistema sorgo - *C. sublineola* ocorre logo após a penetração nas células epidérmicas. Em cultivares suscetíveis, o patógeno atinge as células epidérmicas e estas permanecem vivas após a invasão (fase biotrófica). Hifas primárias se proliferam e se ramificam ao redor dessas células dando início à formação das hifas secundárias. Quando as hifas secundárias alcançam o mesófilo foliar ocorre a morte celular (fase necrotrófica), seguida da formação das lesões necróticas e acérvulos. Em cultivares resistentes, ao contrário, não é observada a interação biotrófica, e as células epidérmicas infectadas rapidamente acumulam inclusões citoplasmáticas pigmentadas contendo fitoalexinas que previnem o desenvolvimento do fungo (Wharton & Julian, 1996). De acordo com Basavaraju et al. (2009), um maior acúmulo de H₂O₂ nas fases iniciais do processo de infecção pode ser observado em materiais resistentes, porém pouco H₂O₂ foi acumulado em genótipos suscetíveis de sorgo nesta fase biotrófica de infecção. Estes autores sugeriram o envolvimento do H₂O₂ na resistência à antracnose em sorgo devido a inibição do crescimento do patógeno.

Um segundo tipo de conídio de formato oval foi descrito por Souza-Paccola et al. (2003a), quando *C. sublineola* é cultivado em meio de cultura líquido. Os conídios ovais têm formato ovalado, parede celular mais fina que os conídios falcados e são portadores de um a três núcleos embora a maioria seja uninucleada. Segundo Souza-Paccola et al. (2003a) o conídio oval, de forma semelhante ao conídio falcado, induz sintomas da doença em folhas de sorgo. Entretanto pouco é conhecido sobre o conídio oval e sua capacidade de infecção, sendo este um fator que pode diretamente afetar a eficiência de controle do patógeno, pois permite

entender o seu papel biológico no processo de infecção e de desenvolvimento da antracnose em sorgo. Em estudos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa, foi descrito a ontogênese dos conídios ovais de *C. sublineola* e o potencial de sua utilização em testes de patogenicidade e em estudos genéticos para obtenção de mutantes e de heterocários (Souza-Paccola et al., 2003a,b; Nunes et al., 2010; Souza-Paccola et al., 2015). No presente estudo, o objetivo foi comparar o processo de infecção entre conídios ovais e falcados de *C. sublineola* em cultivares de sorgo suscetível e resistente ao patógeno.

2. Metodologia

Plantas de sorgo

As sementes de *S. bicolor*, cultivar suscetível BR009 e cultivar resistente SC283, foram cedidas pela Embrapa Milho e Sorgo - Sete Lagoas, MG, Brasil. As plantas foram cultivadas em vasos de cerâmica de 25 cm de diâmetro por 30 cm de altura contendo a mistura de turfa, perlita e solo (1:2:1), e crescidas em casa de vegetação por 25 dias com fotoperíodo de 12 h. Após este período, as folhas foram destacadas das plantas e levadas ao laboratório para os procedimentos de inoculação dos conídios. As folhas foram lavadas com água destilada e sabão neutro e cortadas com estilete esterilizado. Segmentos foliares de 1,5 × 1,5 cm, com superfície adaxial voltada para cima, foram depositados em placas de Petri sobre duas camadas de papel de filtro umedecidas com 1,6 mL de água destilada. Todo material utilizado foi previamente autoclavado a 121 °C por 30 min.

Preparação do inóculo e inoculação

Para inoculação foram utilizados conídios falcados e ovais do isolado monospórico 204.01 de *C. sublineola* gentilmente fornecidos pela Embrapa Milho e Sorgo de Sete Lagoas, MG, Brasil.

Obtenção de conídios falcados: o isolado de *C. sublineola* foi cultivado em Ágar Farinha de Aveia, sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) à temperatura de $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, durante seis dias. A produção de conídios falcados foi induzida pelo método mecânico de raspagem do micélio com auxílio de uma lâmina de metal e as culturas incubadas novamente nas mesmas condições de cultivo. Após 10 dias foram adicionados às placas, 9 mL de solução salina (0,85%) acrescida de 2,5 mL de solução de polissorbato-80 (0,01%). A superfície de

cada cultura foi gentilmente esfregada com uma alça de Drigalski para liberação dos conídios falcados. A suspensão foi coletada e filtrada através de gaze esterilizada e centrifugada a 6000 g por 5 min. O precipitado foi ressuspendido em 2 mL solução aquosa esterilizada de polissorbato-80 (0,01%) e centrifugado novamente. O procedimento foi repetido por três vezes.

Obtenção de conídios ovais: três discos de 10 mm de diâmetro, contendo micélio do isolado de *C. sublineola* foi inoculado em 50 mL de meio de cultura de Caldo Batata Dextrose (CBD) e incubado sob agitação (60 rpm) por quatro dias a 22 ± 3 °C sob iluminação fluorescente contínua ($50 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$). A cultura foi filtrada em gaze esterilizada e posteriormente centrifugada a 6000 g por 5 min. O precipitado foi ressuspensão em 2 mL solução aquosa de polissorbato-80 (0,01%) e centrifugado novamente. O procedimento foi repetido por três vezes.

O número de conídios falcados e ovais foi estimado em câmara de Neubauer (Boeco, Germany) e a concentração final ajustada para 3×10^6 conídios mL^{-1} em solução salina (0,85%). Os segmentos foliares foram uniformemente inoculados por borrifo com 0,02 mL da suspensão de conídios falcados ou ovais (3×10^6 conídios mL^{-1} em solução salina à 0,85%) com borrifadores que liberaram gotículas de 0,5 a 1 mm de diâmetro. Controles foram inoculados somente com solução salina (0,85%) sem os conídios. As placas foram incubadas à 23 ± 1 °C sob luz fluorescente contínua ($50 \mu\text{E m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), com quatro repetições para cada tratamento.

Análises por microscopia

Os segmentos foliares foram clarificados em 1,5 mL de solução de álcool acético (1:3, ácido acético glacial:etanol 95%) (Khan & Hsiang, 2003) durante 24 h e o processo repetido duas vezes com uma solução de álcool acético a cada 24 h. As folhas clarificadas foram colocadas durante 5 min em uma solução do corante trypan blue (0,05%; massa/volume) em lactofenol (20% de fenol, 20% de ácido lático, 40% de glicerina e 20% de água destilada). Após a coloração, as folhas foram depositadas sobre lâminas com a superfície adaxial voltada para cima e então cobertas com lamínula. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico e fotografadas em fotomicroscópio (AXIOPHOT Zeiss®).

As observações foram realizadas em intervalos de 2 h até 10 h após inoculação (AI), seguido de observação em intervalos de 24 h até 168 h AI e duas semanas AI. Foi avaliado o comportamento de 25 conídios quanto à germinação, formação de apressórios, de poros de

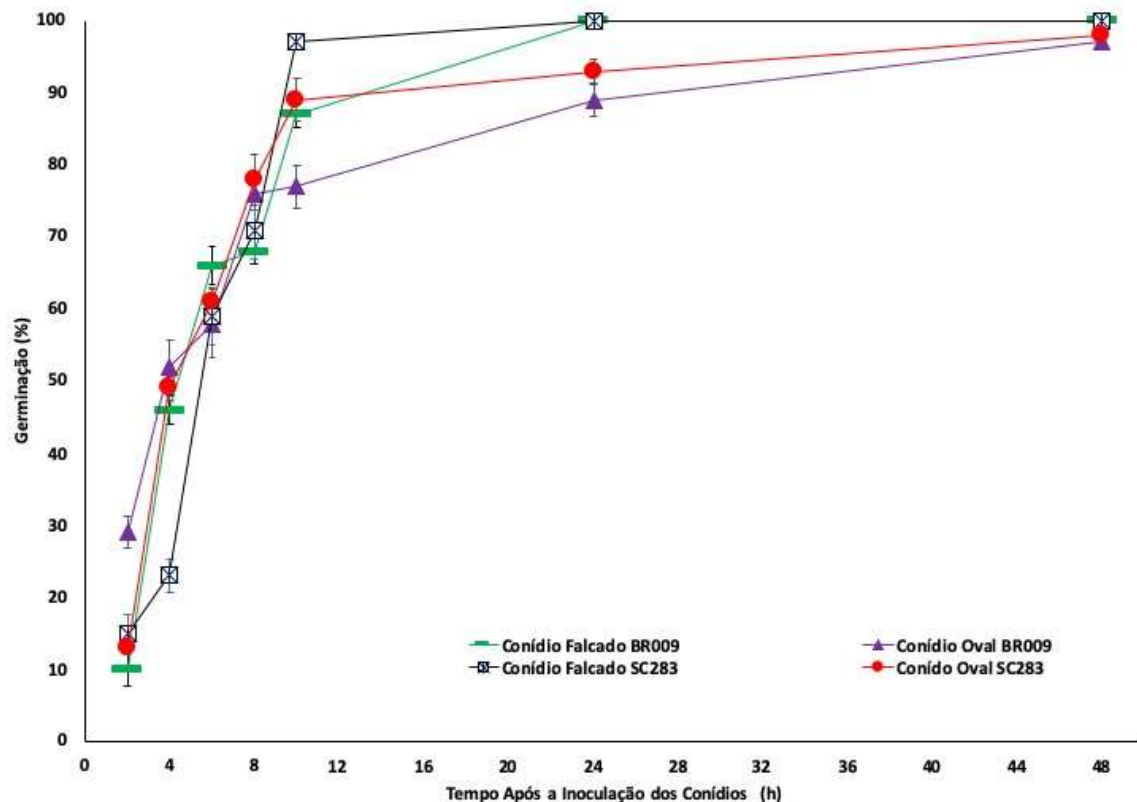
penetração, de hifas de infecção e de acérvulos. O conídio foi considerado germinado quando o tubo germinativo atingiu um comprimento equivalente a pelo menos 50% do seu tamanho. Apressórios originados a partir de fragmentos de micélio foram desconsiderados.

3. Resultados

Embora apresentando diferenças, ambos os conídios colonizaram e infectaram as duas cultivares, primeiramente de forma subcuticular e depois de forma intracelular. O processo de germinação, formação de apressório e penetração foram semelhantes nas interações compatíveis e incompatíveis. O processo foi acompanhado desde a germinação dos conídios até a formação das lesões contendo corpos de frutificação assexuais (acérvulos).

Germinação: conídios ovais, à semelhança dos falcados, germinaram em todos os tratamentos (Figura 1) e foram capazes de infectar e desenvolver estruturas de infecção sobre as folhas nas duas cultivares de sorgo. Os conídios iniciaram o processo de germinação 2 h AI e a frequência de germinação foi progressiva com o passar do tempo de incubação (Figura 1). De forma geral, a porcentagem de germinação dos conídios ovais e falcados do fungo foi semelhante nas duas cultivares (Figura 1).

Figure 1. Germinação de conídios ovais e falcados de *Colletotrichum sublineola* sobre a superfície foliar adaxial de cultivares de sorgo suscetível (BR009) e resistente (SC283) à antracnose.



Fonte: Autores.

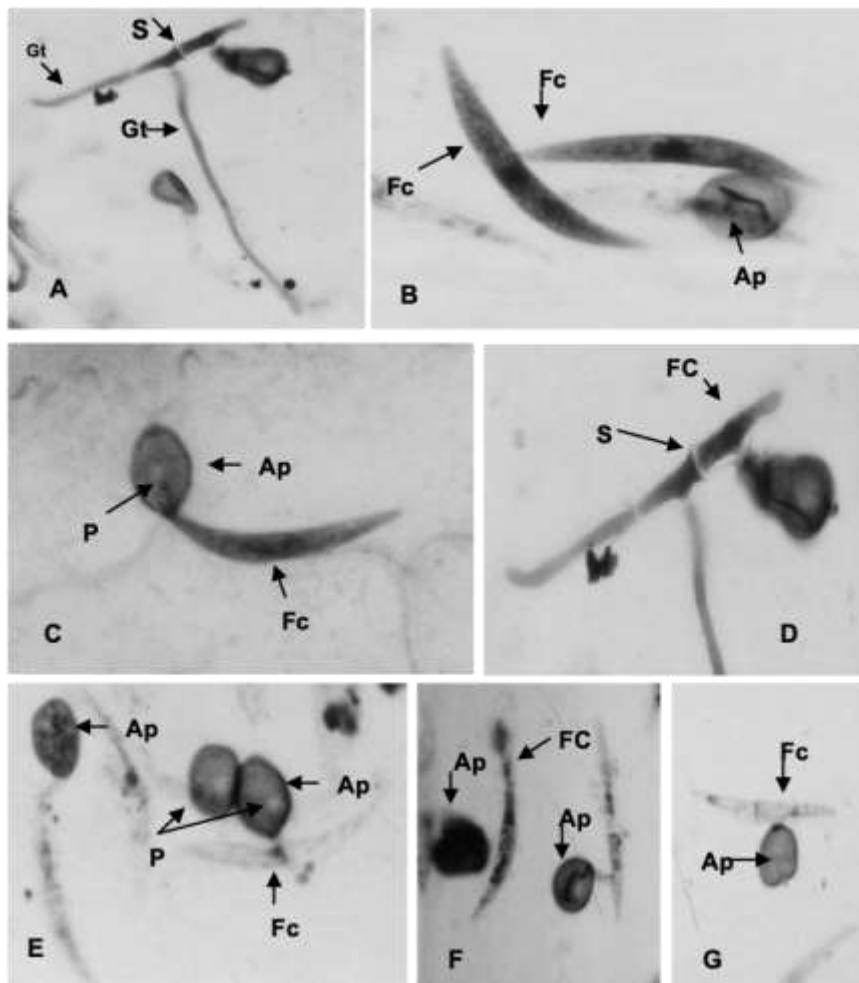
Ambos os conídios emitiram tubos germinativos na superfície foliar dos dois cultivares de sorgo. Conídios falcados emitiram um ou dois tubos germinativos na sua extremidade e/ou lateralmente (Figura 2A). Um septo central foi formado no interior do conídio falcado, 96 h AI, depois do alongamento do tubo germinativo (Figura 2B). Os conídios ovais entumesceram antes de germinarem (Figura 3A) e, ao contrário dos falcados, emitiram somente um tubo germinativo durante o processo. As Figuras 3B e 3C mostram o tubo germinativo emergindo de uma das extremidades do conídio oval. Diferentemente do que ocorreu nos conídios falcados, não foi observada a formação de septo interno nos conídios ovais após a emissão do tubo germinativo.

Formação do apressório: a formação do apressório ocorreu logo após a germinação, porém de forma diferenciada entre os dois tipos de conídio. Apressórios provenientes de conídios falcados foram produzidos diretamente dos conídios (Figura 2A–G), enquanto que

nos conídios ovais, estas estruturas formaram-se a partir dos tubos germinativos já alongados (Figura 3D–F).

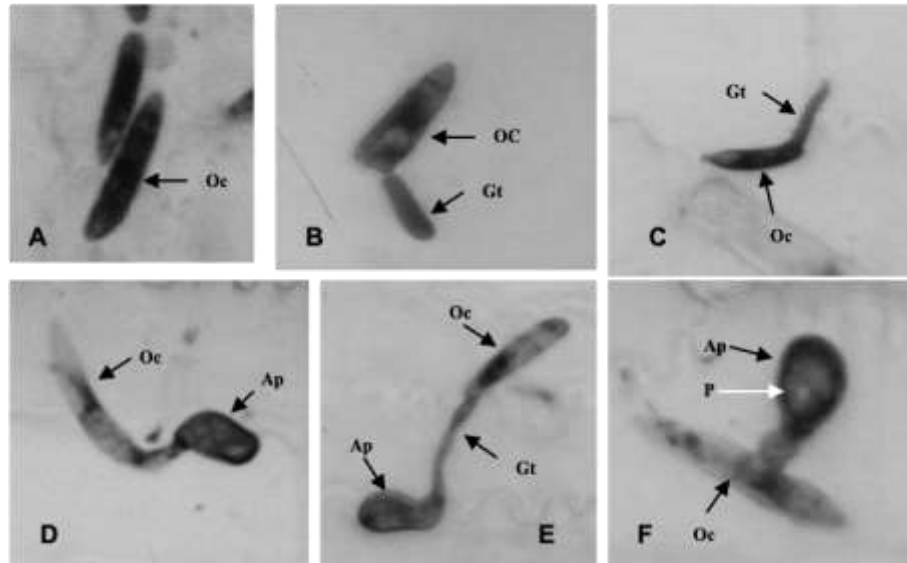
Apressórios oriundos de conídios falcados apresentaram forma arredondada com superfície lisa (Figura 4A–B), enquanto que apressórios de conídios ovais foram ligeiramente irregulares (Figura 4C–G). Apressórios jovens de ambos os conídios se mostraram hialinos, entretanto as paredes tornaram-se mais espessas e escuras com o acúmulo de melanina durante o processo de maturação. Apressórios resultantes de conídios ovais após entumescerem tornaram-se separados do tubo germinativo por meio de um septo (Figura 4F).

Figura 2. Tecido foliar de sorgo (*Sorghum bicolor*) tratado com álcool acético e corado com trypan blue (0,05%), demonstrando o processo de germinação de conídios falcados do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola* e formação de apressórios: (A) Conídio falcado (Fc), apresentando dois tubos germinativos, um na extremidade do conídio e outro na lateral (escala 20 μm); (B) Conídios falcados 10 h AI, um conídio não germinado e o outro iniciando a formação do apressório (Ap) (escala 10 μm); (C) Conídio falcado (Fc), 10 h AI, mostrando o início da formação de apressório diretamente do conídio e apresentando poro de penetração (escala 10 μm); (D) Formação do septo (S) no conídio falcado, 96 h AI, e presença de apressório já melanizado (escala 20 μm); (E–G) Conídios falcados (Fc) com apressórios (Ap) melanizados mostrando poros de penetração (escala : (E) 20 μm ; (F) 15 μm ; (G) 10 μm).



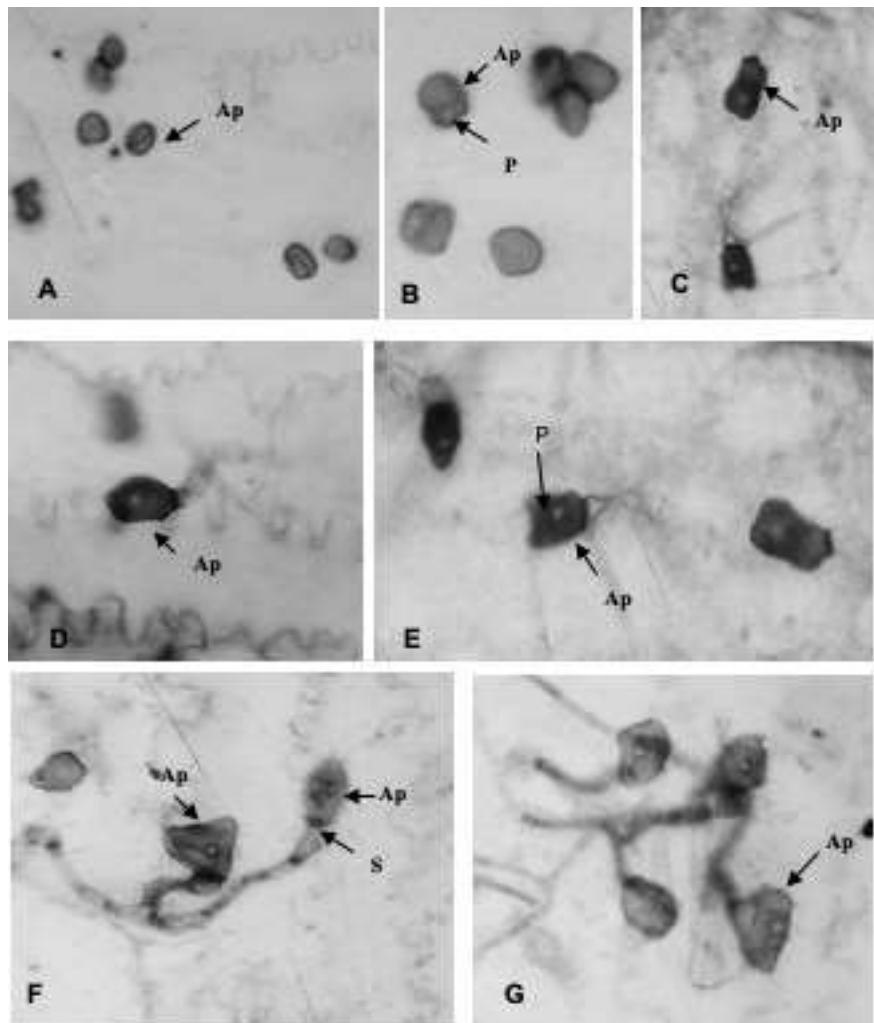
Fonte: Autores.

Figura 3. Germinação de conídios ovais de *Colletotrichum sublineola* sobre tecido foliar de sorgo (*Sorghum bicolor*), após clarificação com álcool acético e coloração com trypan blue (0,05%), e formação de apressórios: (A) Conídios ovais (Oc) com 2 h AI (escala 25 μm); (B) Conídio oval (Oc) com 4 h AI emitindo tubo germinativo (Gt) (escala: 9 μm); (C) Conídio oval (Oc) com tubo germinativo (Gt) se alongando (escala: 10 μm); (D–E) Conídio oval (Oc) com 10 h AI com formação do apressório (Ap) próximo ao conídio (escala 20 μm) e a partir do tubo germinativo (Gt) (escala 10 μm); (F) Apressório (Ap) com poro de penetração (P) formado a partir de um conídio oval (escala 10 μm).



Fonte: Autores.

Figura 4. Tecido foliar de sorgo demonstrando a morfologia de apressórios com os poros de penetração, formados a partir de conídios falcados (A–B) e ovais (C–G), no isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola* após inoculação em segmentos foliares de sorgo (A–G). (A): apressórios (Ap) arredondados de superfície lisa, formados 48 h AI de conídios falcados (escala 20 μm); (B): poro de penetração (P) no centro de um apressório melanizado (Ap) formados a partir de conídios falcados (escala 9 μm); (C–E): apressórios (Ap) com formato irregular contendo poro de penetração (P) na região central, formados após a germinação de conídios ovais com 10 h AI (escala 10 μm); (F–G): apressórios (Ap) irregulares com poro de penetração (escala 10 μm) formados 168 h AI dos conídios ovais.

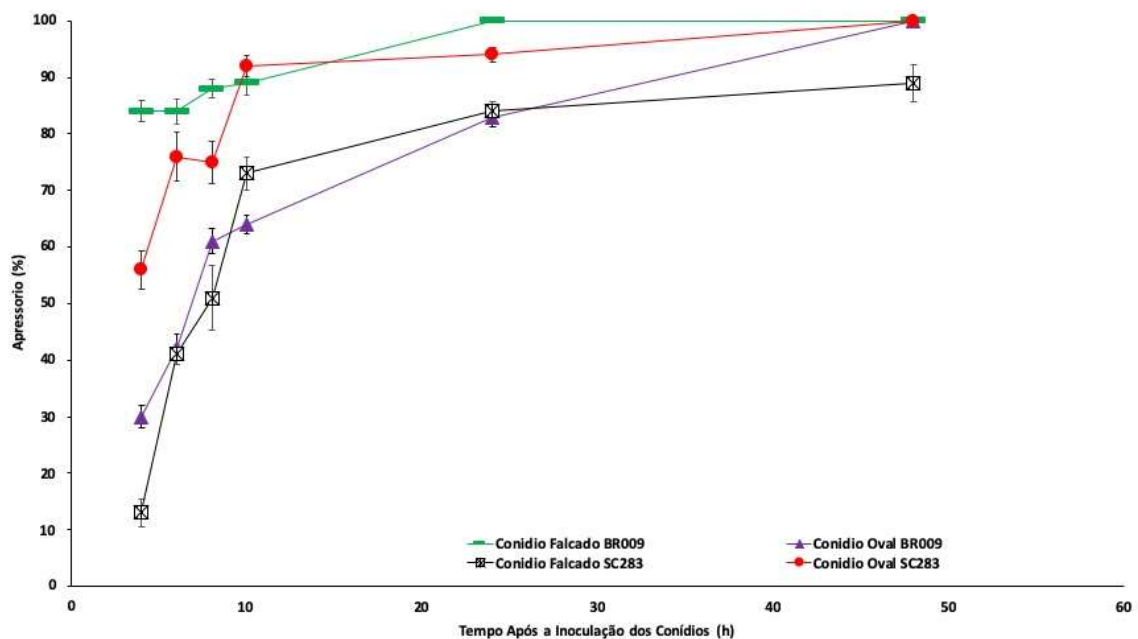


Fonte: Autores.

Ambos os conídios iniciaram o processo de formação do apressório 4 h AI, independente da cultivar (Figura 5). Porém, conídios falcados foram mais agressivos na formação de apressórios quando inoculados na cultivar suscetível. No período de 4 h AI cerca de 84% dos conídios falcados já haviam emitido apressórios sobre a superfície foliar da cultivar suscetível (BR009) enquanto que os conídios ovais atingiram frequência similar

somente 24 h AI nesta mesma cultivar, demonstrando a agressividade dos conídios falcados na emissão desta estrutura de fixação em material suscetível. Por outro lado, esse mesmo comportamento pode ser observado pelos conídios ovais inoculados no cultivar resistente. No material resistente os conídios ovais se mostraram mais agressivos na formação de apressórios quando comparado aos falcados. Com apenas 4 h AI cerca de 56% dos conídios ovais já haviam produzido apressórios sobre a superfície foliar da cultivar resistente contra 17% dos conídios falcados. Mesmo após 48 h AI na superfície foliar da cultivar resistente, os conídios ovais se mostraram mais agressivos na formação de apressórios comparados aos conídios falcados (Figura 5).

Figura 5. Formação de apressórios resultantes da germinação de conídios ovais ou falcados do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola* inoculados em folhas de cultivares de sorgo suscetível (BR009) e resistente (SC283) à antracnose.



Fonte: Autores.

Poros de penetração: o poro de penetração foi visualizado como um ponto claro, pequeno e circular no centro do apressório (Figura 2C, 2E, 3F e 4D). É no poro que se forma o grampo de penetração, uma estrutura pequena e embutida na parede celular que dificilmente pode ser visualizada pela microscopia ótica.

A formação do poro de penetração teve início 10 h AI dos conídios na cultivar resistente e na suscetível (Tabela 1), porém foi dependente do tipo de conídio. Apressórios

originados de conídios falcados desenvolveram poros de penetração em frequência maior na superfície foliar da cultivar suscetível. Nesse mesmo material, os poros de penetração foram vistos em apressórios oriundos de conídios ovais somente 24 h AI. Na cultivar resistente, os poros de penetração, apesar de serem visualizados em todos os tratamentos 10 h AI, a frequência de formação dessas estruturas foi maior nos apressórios originados a partir de conídios ovais em todos os tempos avaliados (Tabela 1).

Tabela 1. Formação de poro de penetração em apressórios originados da inoculação de conídios falcados e ovais do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola* sobre folhas de sorgo de cultivares suscetível (BR009) e resistente (SC283) à antracnose (n = 4, com 25 conídios por repetição).

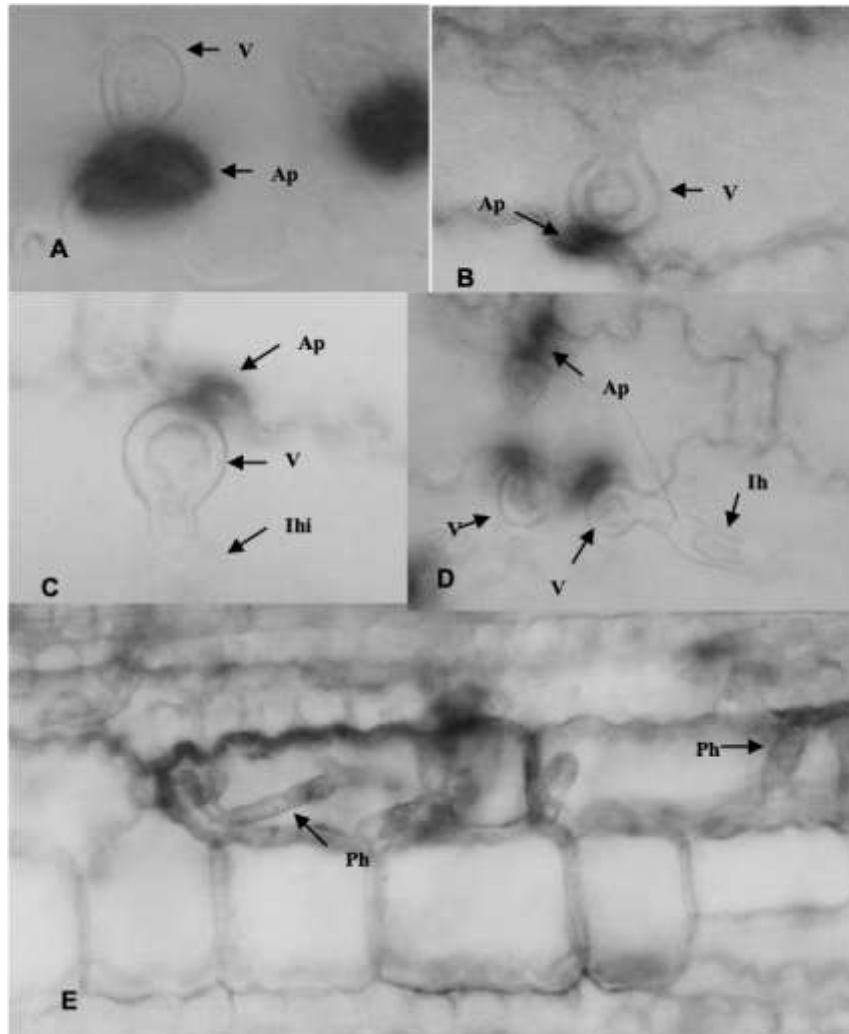
Cultivar	Tempo após inoculação conidial											
	4 h		6 h		8 h		10 h		24 h		48 h	
	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval	Falcado	Oval
BR009	0	0	0	0	0	0	13 aA	0 bB	23 aB	25 aA	63 aA	49 aA
SC283	0	0	0	0	0	0	3 bB	9 aA	6 bB	15 bA	28 bB	39 bA

Médias com diferentes letras minúsculas na coluna e letras maiúsculas na linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Autores.

Hifas e vesículas de infecção: a formação dos poros de penetração marcou o início dos eventos de penetração e o início da fase biotrófica. Não existiu diferenças nos eventos de penetração entre os dois tipos de conídios. Tanto conídios falcados como ovais desenvolveram hifas de infecção logo abaixo dos apressórios (Figura 6A e 6B), as quais aumentaram de volume, tornando-se globosas e intumescidas, originando as vesículas de infecção (Figura 6A–D). Após a formação dessas vesículas foi possível observar o desenvolvimento das hifas primárias, responsáveis pelo processo de colonização no interior das células epidérmicas do hospedeiro (Figura 6E).

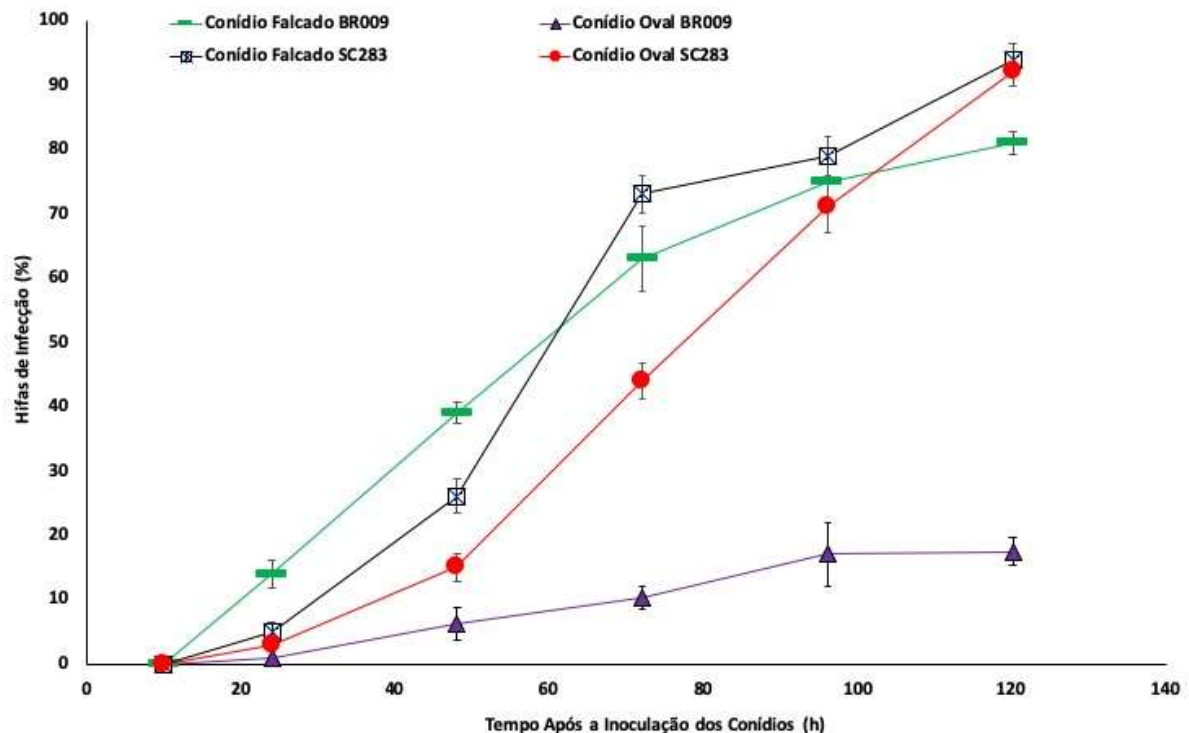
Figura 6. Vesículas e hifas de infecção formadas durante o processo de penetração do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola* em folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*) (A–E). A–B: Vesículas de infecção (V) formadas abaixo de apressórios melanizados (Ap) após 48 h AI de conídios falcados. escala: (A) 11 μm ; (B) 60 μm); C–D: Vesículas de infecção (V), apressórios (Ap) e hifas de infecção (Ih) formadas 48 h AI de conídios ovais. escala: (C) 9 μm ; (D) 11 μm); (E) 120 h AI dos conídios ovais, hifa primárias (Ph) se desenvolvem intracelularmente e colonizam células epidérmicas adjacentes (escala 20 μm).



Fonte: Autores.

É possível observar que a frequência de formação das hifas de infecção diferiu entre os dois tipos de conídios (Figure 7). Hifas de penetração foram formadas 24 h AI de ambos os conídios nas duas cultivares, porém, até 96 h AI, a frequência de formação destas foi maior nos conídios falcados, independente da cultivar. No entanto, 120 h AI, na cultivar resistente, essa diferença não foi mais observada para ambos os conídios (Figura 7).

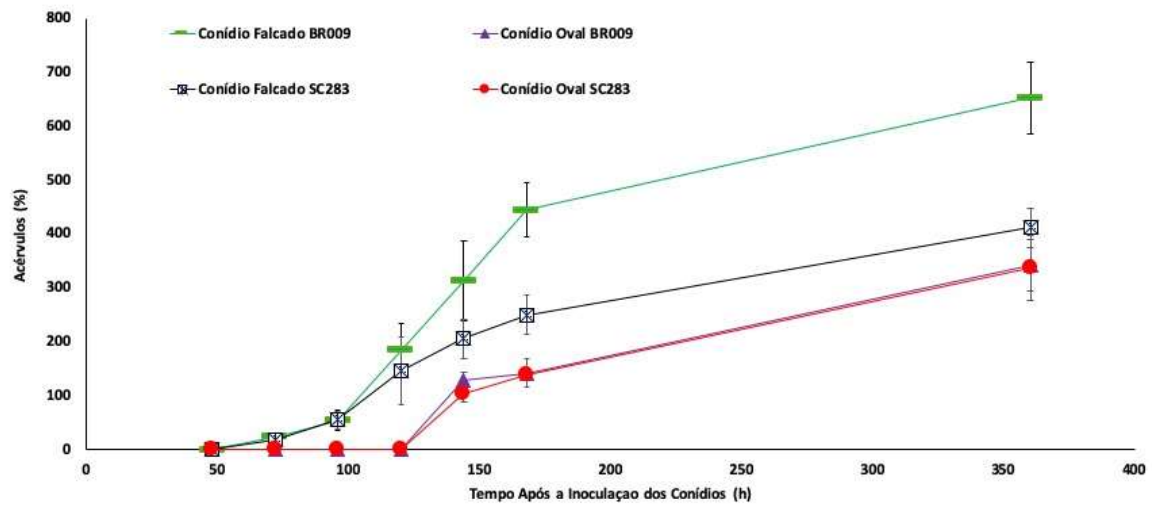
Figura 7. Formação de hifas de infecção em diferentes tempos após inoculação de conídios falcados e ovais provenientes do isolado 204.01 (A) de *Colletotrichum sublineola* em folhas de sorgo (*Sorghum bicolor*) cultivar suscetível (BR009) e resistente (SC283).



Fonte: Autores.

Acérvulos: os primeiros sintomas visíveis da doença, caracterizados pela formação de lesões de coloração alaranjada e seguida da formação dos acérvulos, foram visualizados 72 h AI primeiramente no material inoculado com conídios falcados (Figura 8). Acérvulos foram vistos no material inoculado com conídios ovais somente 144 h AI e em uma frequência bem inferior comparada a aquela dos conídios falcados. Inicialmente verificou-se uma pigmentação de cor laranja nos tecidos infectados, seguida da formação de lesões necrosadas contendo os acérvulos na região central. Acérvulos contendo setas, emergiram através da cutícula e em seguida foi visualizado a formação de conídios falcados. Os sintomas da doença se manifestaram primeiramente nas folhas inoculadas com conídios falcados, de forma mais agressiva comparada aos conídios ovais, e o número de acérvulos formados foi bem inferior na cultivar resistente (SC283).

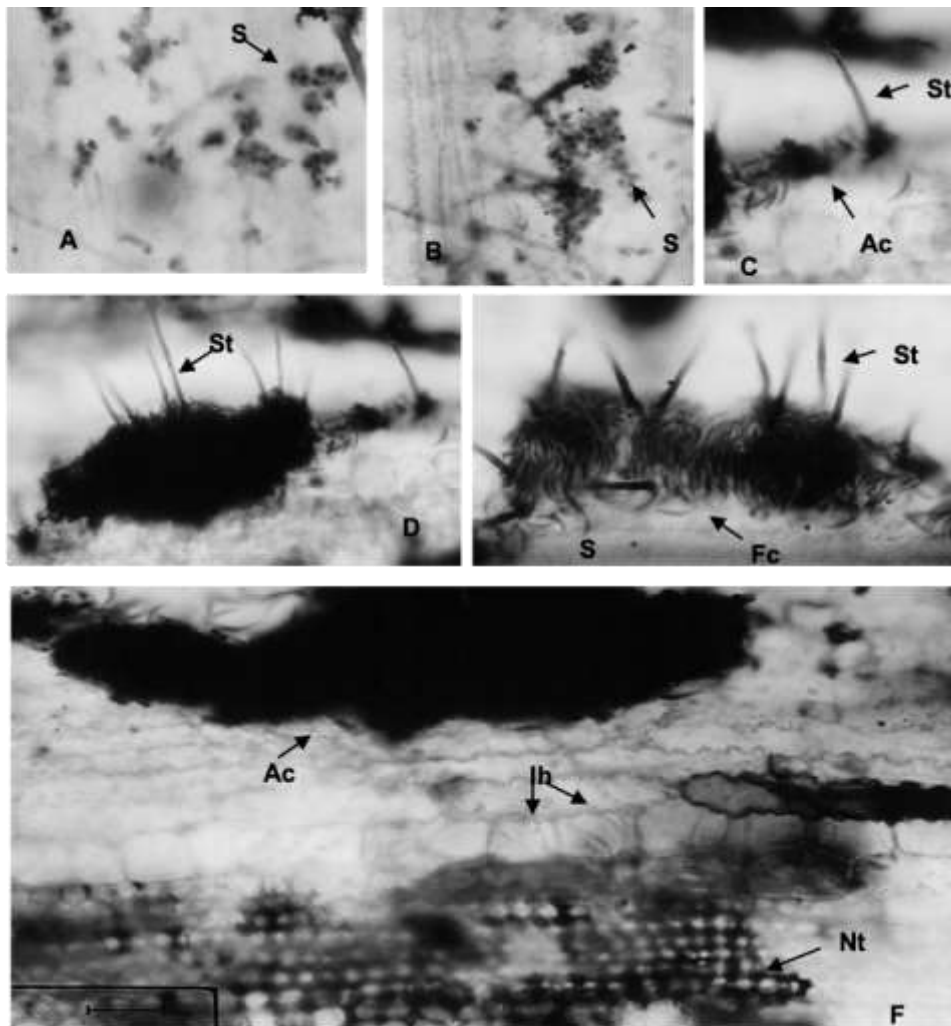
Figura 8. Porcentagem de acérvulos formados no processo de infecção de conídios falcados ou ovais do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola* sobre folhas de sorgo cultivar suscetível (BR009) e resistente (SC283).



Fonte: Autores.

A Figura 9 mostra os acérvulos formados no tecido foliar inoculado com conídios ovais. O processo inicia-se com a formação de emaranhados miceliais (*mycelial knots*) resultantes de um acúmulo de hifas que se agregam na superfície celular (Figura 9A). Com 96 h AI, um proto-estroma acervular (S) foi formado abaixo da cutícula (Figura 9B). Este proto-estroma aumentou em tamanho rompendo a cutícula (Figura 9C) e, 144 h AI, os acérvulos jovens puderam ser observados. Estes acérvulos receberam uma deposição de melanina que os tornou bastante escuros (Figura 9D). Também foram evidentes as setas e os conidióforos onde conídios falcados puderam ser observados em abundância (Figura 9E–F). Estes resultados demonstram que conídios ovais também são infectivos e, embora menos agressivos que os conídios falcados, desenvolveram lesões com acérvulos onde são produzidos os conídios falcados, fechando assim o ciclo de infecção.

Figura 9. Tecido foliar de sorgo (*Sorghum bicolor*) demonstrando formação de acérvulos a partir de conídios ovais do isolado 204.01 de *Colletotrichum sublineola*. (A–B) Agregação de hifas e a formação do estroma (S) 96 h AI (escala 50 μ m); (C–E) Acérvulos (Ac) emitindo setas (St) e conídios falcados (Fc) em abundância 144 h AI (escala 50 μ m); (F) Acérvulo (Ac) produzindo conídio falcado (Fc), hifas de infecção (Ih) nas células do tecido foliar e tecido necrosado (Nt) (escala 40 μ m).



Fonte: Autores.

4. Discussão

O agente patogênico da antracnose em sorgo, o fungo *C. sublineola*, é responsável por severas perdas na cultura em vários países produtores desta gramínea. A infecção foliar decorrente deste patógeno, pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento da planta, mas os sintomas geralmente são observados 40 dias após a emergência das plântulas (Prom et al., 2009). Lesões pequenas, circulares a elípticas, medindo em torno de 5 cm de diâmetro,

caracterizam o início dos sintomas da antracnose foliar em sorgo. À medida em que as lesões evoluem, centros necróticos de coloração palha contendo corpos de frutificação escuros (acérvulos) podem ser visualizados. As bordas das lesões podem ser avermelhadas, alaranjadas ou castanhas, dependendo da cultivar (da Costa et al., 2013). Setas longas e septadas emergem dos acérvulos entre os conidióforos onde são produzidos conídios hialinos, unicelulares e falciformes, chamados de conídios falcados, descritos como sendo a fonte primária de inóculo e de propagação deste patógeno.

Sintomas da antracnose também podem ocorrer na nervura central das folhas e, segundo Thakur & Mathur (2000), a infecção na nervura ocorre de forma independente da infecção foliar. Nesta região as lesões são elípticas a alongadas, de coloração avermelhada, púrpura ou escura, onde são também observados acérvulos. As lesões de antracnose também podem surgir nos entrenós do caule, tendo como consequência a podridão do colmo que resulta em um bloqueio na translocação de água e de fotoassimilados, prejudicando a produção de grãos. Os conídios produzidos nas lesões do colmo podem penetrar o pedúnculo floral e infectar as flores, causando a antracnose da panícula que afeta a qualidade dos grãos (Ribeiro et al., 2020).

Os conídios falcados são frequentemente utilizados como propágulos em testes de patogenicidade (Crouch et al., 2009; Silva et al., 2014). No entanto, um outro tipo de conídio, um conídio secundário foi descrito para *C. sublineola* por Souza-Paccola et al. (2003a). Este conídio de tamanho menor comparado ao falcado, tem forma oval a elíptica, e é produzido blasticamente a partir de hifas em culturas líquidas, já tendo sido também observados em lesões foliares (Souza-Paccola et al., 2015). Segundo Souza-Paccola et al. (2003b) a produção de conídios ovais representa uma alternativa promissora para estudos genéticos e de patogenicidade, principalmente em linhagens do patógeno que produzem pouco ou nenhum conídio falcado. Os conídios falcados são uninucleados enquanto que os conídios ovais são portadores de um a três núcleos, sendo a maioria uninucleados (Souza-Paccola et al., 2003a; Nunes et al., 2010). Ambos os tipos de conídios produzem sintomas em sorgo quando inoculadas sob condições controladas (Souza-Paccola et al., 2003b; 2015).

Um tipo semelhante de dimorfismo conidial foi descrito anteriormente por Nishihara (1975) em *Colletotrichum graminicola*, o agente causal da antracnose em milho (*Zea mays*), considerada espécie irmã de *C. sublineola* devido às semelhanças morfológicas entre elas. Apesar de muito semelhantes morfológicamente, estas duas espécies são isoladas reprodutivamente (Vaillancourt & Hanau, 1992). Conídios falcados de *C. graminicola*, semelhantes àqueles de *C. sublineola*, também são uninucleados enquanto que conídios ovais

apresentam de um a três núcleos (Panaccione et al., 1989; Nordzieke et al., 2019). Nishihara (1975) reportou que conídios ovais de *C. graminicola* são produzidos apenas em cultura líquida, porém Panaccione et al. (1989) relataram a ocorrência deste tipo de conídio *in vitro* e em lesões foliares de milho. Recentemente Nordzieke et al. (2019), estudando os conídios de *C. graminicola*, confirmaram a origem distinta dos conídios falcados e ovais. Os primeiros são formados na superfície das lesões e seriam os responsáveis pela disseminação do patógeno no ambiente, enquanto que os ovais são formados no sistema vascular e estariam associados à colonização do fungo no interior da planta infectada.

Pouco é conhecido sobre o papel dos conídios ovais na infecção foliar em *C. sublineola*. Neste trabalho comparamos o processo de infecção entre os dois tipos de conídios, o falcado e o oval, no patossistema *C. sublineola*-sorgo em duas cultivares de sorgo com diferentes reações de resistência e suscetibilidade à antracnose.

Os resultados deste estudo demonstraram que o processo de infecção dos conídios ovais em folhas de sorgo é semelhante ao dos falcados, com pequenas variações. Ambos os conídios, uma vez na superfície do segmento foliar, intumesceram, e deram início ao processo de germinação 2 h AI. Transcorridas 48 h AI, praticamente todos os conídios já haviam emitido tubos germinativos. A germinação é um processo de transição de uma estrutura dormente para uma estrutura vegetativa, sendo dependente de fatores endógenos e exógenos específicos para cada espécie e tipo de conídio (Wyatt et al., 2013). O tempo de germinação dos conídios dentro do gênero *Colletotrichum* é bastante variável (2 a 96 h AI). Essa variabilidade também acontece entre isolados dentro de uma mesma espécie, sendo dependente de diversos fatores como temperatura, umidade relativa, nutrientes disponibilizados, entre outros (Pereira et al., 2009; Maia et al., 2011).

Conídios falcados de *C. sublineola* após germinarem, desenvolveram um septo transversal e emitiram um ou dois tubos germinativos, na extremidade e/ou lateralmente na região central. Esta emissão múltipla de tubo germinativo nos conídios falcados foi relatada anteriormente para *C. sublineola* (Souza-Paccola et al., 2015) e em outras espécies deste mesmo gênero (Lins et al., 2007; Pereira et al., 2009). Por outro lado, os conídios ovais emitiram apenas um tubo germinativo.

Segundo Chaky et al. (2001), os conídios ovais de *C. graminicola*, comparado aos conídios falcados, germinam de forma bastante eficiente mesmo quando em água, independente da hidrofobicidade da superfície, demonstrando serem pouco exigentes nutricionalmente no processo de germinação. Os autores atribuíram essa característica às funções biológicas exercidas por cada tipo de conídio na patogenicidade, ou seja, conídios

falcados são produzidos na superfície foliar e são os propágulos primários de infecção, enquanto que os conídios ovais são produzidos dentro dos tecidos das plantas, sendo responsáveis pela disseminação sistêmica do patógeno no interior da planta (Panaccione et al., 1989), o que explicaria a pouca importância da hidrofobicidade da superfície no processo de germinação destes (Chaky et al., 2001).

O pré-requisito para que ocorra a patogênese de um fungo é a sua eficiência de adesão à superfície foliar do hospedeiro. Porém, anterior à adesão, etapas de reconhecimento, de atração e de contato entre patógeno e hospedeiro são necessárias, e ocorrem por meio dos conídios. Uma troca de sinais entre patógeno e planta, sinaliza o início desta interação. Estes sinais secretados pelos patógenos, incluem principalmente proteínas, açúcares e lipopolissacarídeos (Boyd et al., 2013) e são os determinantes para a colonização no hospedeiro e o estabelecimento de reações de suscetibilidade e de resistência. A interação inicial entre planta e patógeno ocorre a nível de apoplasto e é mediada pelo reconhecimento entre proteínas e outros metabólitos secretados por ambos, hospedeiro e patógeno (Dodds & Rathjen, 2010; Gupta et al. 2015). Sendo assim, a penetração e a infecção somente serão bem-sucedidas havendo uma eficiente adesão (Rhoden et al. 2019). *Colletotrichum* spp. utilizam de estruturas especializadas para a infecção da planta, incluindo tubos germinativos, apressórios, hifas intracelulares e hifas necrotróficas secundárias desenvolvidas após a fixação do patógeno na superfície da planta (Diéguez-Urbeondo et al., 2005; Liao et al., 2012; Vargas et al., 2012; Joshi, 2018).

Em *C. sublineola* as fases de reconhecimento, de adesão e de infecção de conídios falcados, já foram bem estabelecidas (Basavaraju et al., 2009; Crouch & Beirn, 2009; Xavier et al., 2017), porém pouco é conhecido sobre as fases de infecção de conídios ovais em folhas de sorgo. Os resultados demonstraram que o processo de infecção em folhas de sorgo pelos conídios ovais foi semelhante ao dos conídios falcados, independente da cultivar de sorgo ser resistente ou suscetível. Ambos os conídios, após aderirem à superfície do segmento foliar, intumesceram e iniciaram o processo de germinação 2 h AI. No início do processo de germinação, os conídios falcados desenvolveram um septo transversal e emitiram um ou dois tubos germinativos na extremidade e/ou lateralmente na região central. De forma distinta, os conídios ovais não formaram septos e emitiram apenas um tubo germinativo. Esta emissão múltipla de tubo germinativo pelos conídios falcados foi relatada anteriormente em *C. sublineola* (Souza Paccola et al., 2015) e em outras espécies deste gênero (Lins et al., 2007; Pereira et al., 2009), o que demonstra ser uma característica deste tipo de conídio.

Nordzieke et al. (2019) observaram que os conídios falcados de *C. graminicola* secretaram um auto inibidor de germinação, a micosporina-glutamina, que induz este tipo de conídio a entrar em dormência sobre a superfície foliar do hospedeiro até que as condições ambientais se tornem propícias para a sua germinação e posterior infecção. Este auto inibidor está ausente nos conídios ovais, porém sinais indutores de auto fusão são emitidos pelos tubos germinativos oriundos dos conídios ovais, o que promove anastomoses hifais com formação de redes germinativas, das quais se originam as estruturas de infecção. Esta auto fusão durante o processo germinativo não foi observado nos conídios falcados de *C. graminicola*. As diferenças na germinação dos conídios ovais e falcados sobre folhas de milho permitiram Nordzieke et al. (2019) concluir que os conídios falcados são individualmente eficientes na invasão do hospedeiro, enquanto que os conídios ovais necessitam da formação de redes germinativas antes de iniciar o processo de penetração no hospedeiro.

Tubos de anastomoses também foram descritos anteriormente por Roca et al. (2004) em *Colletotrichum lindemuthianum*, *Colletotrichum gossypii* e *Colletotrichum gloeosporioides*. Segundo estes autores, esses tubos de anastomose são formados de forma rápida e abundante e diferem morfológicamente dos tubos germinativos convencionais emitidos pelos conídios, cuja função é promover o desenvolvimento normal de hifas que produzem estruturas especializadas na infecção. Roca et al. (2004) sugeriram que esses tubos de anastomoses possam ser um tipo de hifa adaptativa especializada com função de promover anastomoses diretamente entre os conídios, podendo ser considerado uma parte normal do ciclo de vida de alguns membros desse gênero. Em nosso estudo, os conídios falcados e os ovais emitiram tubos germinativos seguidos do desenvolvimento de estruturas de penetração sem formação de tubos de anastomose por nenhum dos dois tipos de conídios. Diferente do observado na espécie irmã, *C. graminicola*, por Nordzieke et al. (2019), nenhuma rede germinativa necessária para invasão do hospedeiro pelos conídios ovais foi observada.

Anastomoses seguidas da formação de densos heterocários foram previamente descritas por Souza Paccola et al. (2003) em *C. sublineola*. Os autores inocularam conídios ovais portadores de marcas genéticas complementares, tanto em meios sintéticos (*in vitro*) como em plântulas de sorgo. Conídios falcados recombinantes foram isolados tanto no meio de cultivo sintético como a partir de acérvulos produzidos em lesões foliares resultantes da infecção pelos conídios. De acordo com os autores este processo explicaria em parte a variabilidade genética dentro desta espécie. Os resultados obtidos por Souza-Paccola et al. (2003b) somados aos apresentados no presente estudo demonstram que as anastomoses de hifas em *C. sublineola* ocorrem após a penetração das hifas já desenvolvidas e não em tubos

germinativos como descritos para outras espécies deste gênero (Roca et al., 2004; Ishikawa et al., 2012; Mota et al., 2016; Nordzieke et al., 2019).

Semelhante ao que ocorre na maioria de *Colletotrichum* spp., apressórios unicelulares e melanizados foram formados 4 h AI de ambos os conídios em frequência variável entre as duas cultivares de sorgo. De acordo com Bourett & Howard (1990) e Howard & Valent (1996), o início da formação do apressório é dependente da espécie, da linhagem e do substrato, e podem se originar diretamente do conídio ou a partir do tubo germinativo. Nos resultados do presente estudo, os apressórios foram formados diretamente em uma das extremidades do conídio falcado, não estando ligados a um tubo germinativo, ao contrário do que ocorreu nos conídios ovais, onde os apressórios se formaram na extremidade dos tubos germinativos. Após um curto período de crescimento, a extremidade do tubo germinativo do conídio oval intumescceu, se curvou, e deu origem a um apressório unicelular, o qual se tornou separado do tubo germinativo por meio de um septo. Este septo também foi observado separando o apressório recém-formado do conídio falcado.

Apressórios são estruturas essenciais para o processo de infecção. Sinais liberados pela planta hospedeira associados à características físicas da sua superfície foliar desencadeiam a formação dos apressórios (Hamel et al. 2012; Anjago et al., 2018). Uma grande variabilidade na taxa de formação de apressórios foi observada entre as duas cultivares de sorgo. De forma geral, os apressórios foram formados em maior frequência pelos conídios falcados na cultivar suscetível e, na cultivar resistente, essa frequência foi maior no processo de infecção pelos conídios ovais. Uma grande variação na morfologia dos apressórios dentro do gênero *Colletotrichum* tem sido descrita (Lins et al., 2007; Pereira et al., 2009). Apressórios de conídios falcados de *C. graminicola* em *Agrostis palustris* e *Poa annua* variaram de arredondados a ovalados (Browning et al., 1999; Khan & Hsiang, 2003), similares aos apressórios de *C. sublineola* em sorgo (Browning et al., 1999). Apressórios de *C. graminicola* isolados de milho apresentam morfologia e tamanho bastante variável, sendo obovados, piriformes a elípticos, quando pequenos, ou de formato irregular quando maiores, com um a cinco lóbulos (Sutton, 1968). No presente, estudo os apressórios ocorreram em ambos os tipos de conídios, porém, a morfologia destes foi distinta entre eles. Conídios falcados emitiram apressórios com morfologia uniforme e arredondada, enquanto que os apressórios dos conídios ovais eram irregulares.

A maturação do apressório envolve a deposição de uma camada de melanina na parede celular próxima da membrana plasmática (Kubo & Furusawa, 1986), a formação do poro de penetração, a secreção de material da matriz extracelular e finalmente a fixação do

apressório na superfície do hospedeiro (Pain et al., 1996). A camada de melanina é limitada à parede do apressório, conferindo a ele uma pigmentação escura quando visto sob microscopia óptica (Howard & Valent, 1996). Há uma zona central bem mais clara, correspondendo a uma região do apressório isenta de melanina, onde se desenvolve o poro de penetração (Bourett & Howard, 1990). É neste poro que se forma o grampo de penetração, uma estrutura fina, pequena e embutida na parede celular, com capacidade de invadir as células epidérmicas (Wharton & Schilder, 2008; Vargas et al., 2012). Os poros de penetração foram observados em todos os tratamentos, porém um pouco mais tarde e em baixa frequência em apressórios formados a partir de conídios ovais.

Da mesma forma que a frequência de poros de penetração foi maior nos conídios falcados, a frequência de formação de hifas de infecção também ocorreu em proporção superior a partir de conídios falcados. Não foi possível correlacionar a formação das hifas de infecção com a suscetibilidade ou resistência da cultivar.

Foram vistos neste patossistema dois estágios iniciais de colonização, o subcuticular seguido do intracelular. No primeiro estágio, que corresponde ao subcuticular, o grampo de penetração presente no poro de penetração atravessou a cutícula, alcançou a célula epidérmica, sofreu um inchaço, dando origem a uma grande vesícula esférica, a vesícula de infecção, marcando assim o final deste estágio e o início do segundo estágio, o intracelular. A partir de então, as hifas intracelulares primárias sofreram um espessamento e colonizaram as células epidérmicas adjacentes.

Colletotrichum spp. emitem hifas secundárias a partir das hifas primárias, determinando o final da fase biotrófica (Bailey et al., 1992) e iniciando a fase necrotrófica, o que resulta no desenvolvimento dos sintomas necróticos no hospedeiro (Wharton et al., 2001; Anand et al., 2008; O'Connell et al., 2012). Embora Wharton & Julian (1996) tenham relatado o desenvolvimento de hifas secundárias finas em isolados de *C. sublineola* inoculados em folhas de sorgo, no presente estudo não foram observadas estas hifas, apenas as primárias.

Apesar das diferenças morfológicas e da diferença na origem dos conídios falcados e ovais, ambos foram capazes de reproduzir sintomas da doença de forma semelhante. As hifas originárias de ambos os conídios formaram emaranhados miceliais seguido da formação do estroma proto acervular. Acérvulos contendo setas e conidióforos se desenvolveram a partir deste estroma e conídios falcados foram liberados na superfície da lesão, fechando assim o ciclo de infecção. Até o período total de observação, não foram detectados conídios ovais no interior das lesões.

Pelos resultados apresentados, os conídios ovais também são infectivos como os falcados e capazes de desenvolver sintomas de antracnose no sorgo, porém seu real papel e sua contribuição no desenvolvimento da doença ainda não estão esclarecidos.

Considerando que os conídios ovais de *C. sublineola* são facilmente produzidos a partir de hifas em cultura líquida, pode-se supor que hifas primárias que penetram o interior da planta, em contato com líquidos, seja capaz de emitir conídios ovais. O pequeno tamanho destes permitiria uma circulação mais fácil pelos vasos, provocando a antracnose no colmo, de onde alcançariam o pedúnculo floral e infectariam as flores, resultando na antracnose da panícula, afetando de sobremaneira a qualidade e a produtividade dos grãos. De acordo com Casela et al. (1998), a antracnose da panícula e dos grãos de sorgo são resultantes da infecção de conídios falcados produzidos durante a fase foliar da doença, os quais são levados até a bainha das folhas pela água de chuva, onde germinam e penetram pelo pedúnculo ou pela panícula. Acreditamos que os conídios ovais possam participar diretamente neste processo, porém mais estudos devem ser conduzidos para comprovar esta suposição.

5. Conclusão

Dentre os problemas fitossanitários que afetam a cultura do sorgo, a antracnose causada por *C. sublineola* tem ocupado lugar de destaque como sendo uma das doenças responsável por enormes prejuízos na cultura sorgícola no mundo todo. A infecção do patógeno na planta tem início com a adesão e fixação de propágulos fúngicos na superfície do hospedeiro, seguida da germinação e formação das estruturas de infecção. O processo de infecção e de penetração entre os dois tipos de conídios assexuados produzidos por este patógeno mostrou-se muito semelhante, não apresentando diferenças nas estratégias de infecção entre eles, embora diferenças quantitativas tenham sido observadas na formação de apressórios e demais estruturas envolvidas no processo de infecção do hospedeiro. Estas diferenças foram dependentes do tempo de incubação, do tipo de conídio e das cultivares de sorgo. Apressórios oriundos de conídios falcados foram produzidos diretamente nos conídios, enquanto que os apressórios originados dos conídios ovais foram formados nas pontas dos tubos germinativos. Conídios ovais se mostram menos agressivos no desenvolvimento da doença. Os sintomas da doença foram visualizados primeiramente no material inoculado com conídios falcados e o número de lesões portadoras de acérvulos foi superior na cultivar suscetível. Conídios ovais mostraram que são infectivos, porém menos agressivos que os conídios falcados, e foram capazes de desenvolver lesões com acérvulos com produção de

uma grande quantidade de conídios falcados, fechando assim o ciclo de infecção. Nenhum conídio oval foi visto nas lesões foliares, indicando que desempenham um papel disseminativo do patógeno no interior da planta. Estudos adicionais deverão ser conduzidos futuramente, comparando o processo de infecção de ambos os conídios, porém em plantas inteiras, o que auxiliaria a esclarecer a importância e o real papel dos conídios ovais no desenvolvimento da antracnose em sorgo.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação Araucária, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudos.

Referências

- Anand, T., Bhaskaran, R., Raguchander, T., Karthikeyan, G., Rajesh, M., & Senthilraja, G. (2008). Production of Cell Wall Degrading Enzymes and Toxins by *Colletotrichum capsici* and *Alternaria alternata* Causing Fruit Rot of Chillies. *Journal of Plant Protection Research*, 48(4), 437–451. <https://doi.org/10.2478/v10045-008-0053-2>
- Anjago, W. M., Zhou, T., Zhang, H., Shi, M., Yang, T., Zheng, H., & Wang, Z. (2018). Regulatory Network of Genes Associated with Stimuli Sensing, Signal Transduction and Physiological Transformation of Appressorium in *Magnaporthe oryzae*. *Mycology*, 9(3), 211–222. doi:10.1080/21501203.2018.1492981
- Bailey, J. A., O'connell, R. J., Pring, R. J., & Nash, C (1992). Infection Strategies of *Colletotrichum* Species. In: Bailey, J. A. & Jeger, M. J. (Eds.) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Wallingfor, Oxon, UK: C.A.B. International, 88-120.
- Basavaraju, P., Shetty, N. P., Shetty, H. S., de Neergaard, E., & Jorgensen, H. J. (2009). Infection Biology and Defense Responses in Sorghum Against *Colletotrichum sublineolum*. *Journal of Applied Microbiology*, 107(2), 404-415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04234.x>

Bourett, T. M., & Howard, R. J. (1990). *In vitro* Development of Penetration Structures in The Rice Blast Fungus *Magnaporthe grisea*. *Canadian Journal of Botany*, 68(2), 329–342. <https://doi.org/10.1139/b90-044>

Boyd, L. A., Ridout, C., O'Sullivan, D. M., Leach, J. E., & Leung, H. (2013). Plant-Pathogen Interactions: Disease Resistance in Modern Agriculture. *Trends in genetics*, 29(4), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>

Browning, M., Rowley, L. V., Zeng, P., Chandlee, J. M., & Jack-Son, N. (1999). Morphological, Pathogenic and Genetic Comparisons of *Colletotrichum graminicola* Isolates from *Poaceae*. *Plant Disease*, 83(3), 286-292. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1999.83.3.286>

Casela, C. R., Ferreira, A. S., & Santos, F. G. (1998). Associação de Virulência de *Colletotrichum graminicola* à Resistência Genética em Sorgo. *Fitopatologia Brasileira*. 23(2), 143-146.

Casela, C. R., Santos, F., & Ferreira, A. S. (2000). Associações de Patogenicidade e Diversidade Fenotípica de *Colletotrichum graminicola*, Agente Causal da Antracnose em Sorgo. *Fitopatologia Brasileira*, 25(3), 517-521.

Chaky, J., Anderson, K., Moss, M., & Vaillancourt, L. (2001). Surface Hydrophobicity and Surface Rigidity Induce Spore Germination in *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology*, 91(6), 558–564. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.6.558>

Chala, A., Alemu, T., Prom, L., & Tronsmo, A. (2010). Effect of Host Genotypes and Weather Variables on the Severity and Temporal Dynamics of Sorghum Anthracnose in Ethiopia. *Plant Pathology Journal*, 9(1), 39-46. <https://doi.org/10.3923/ppj.2010.39.46>

Cota, L. V., Souza, A. G. C., da Costa, R. V., Silva, D. D., Lanza, F. E., Aguiar, F. M., & Figueiredo, J. E. F. (2017). Quantification of yield losses caused by leaf anthracnose on sorghum in Brazil. *Journal of Phytopathology*, 165(7-8), 479-485. <https://doi.org/10.1111/jph.12582>

da Costa, R. V., Silva, D. D., & Cota, L. V. (2013). Antracnose Foliar do Sorgo. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 18. Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, 196.

Crouch, J. A., & Beirn, L. A. (2009). Anthracnose of Cereals and Grasses. *Fungal Diversity* 39, 19-44.

Crouch, J. A., Clarke, B. B., White Jr., J. F., & Hillman, B.I. (2009). Systematic Analysis of the Falcate-Spored Graminicolous *Colletotrichum* and a Description of Six New Species from Warm-Season Grasses. *Mycologia*, 101(5), 717–732. <https://doi.org/10.3852/08-230>

Diéguez-Uribeondo, J., Förster, H., Soto-Estrada, A., & Adaskaveg, J. E. (2005). Subcuticular-Intracellular Hemibiotrophic and Intercellular Necro-Trophic Development of *Colletotrichum acutatum* on Almond. *Phytopathology*, 95(7), 751-758. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-95-0751>

Dodds, P. N., & Rathjen, J. P. (2010). Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant-Pathogen Interactions. *Nature Reviews Genetics*, 11(8), 539-48. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>

Favaro, L. C., Araújo, W. L., Souza-Paccola, E. A., Azevedo, J. L., & Paccola-Meirelles, L. D. (2007). *Colletotrichum sublineolum* Genetic Instability Assessed by Mutants Resistant to Chlorate. *Mycological Research*, 111(1), 93-105. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2006.08.008>

Gupta, R., Lee, S. E., Agrawal, G. K., Rakwal, R., Park, S., Wang, Y., & Kim, S. T. (2015). Understanding the Plant-Pathogen Interactions in the Context of Proteomics-Generated Apoplastic Proteins Inventory. *Frontiers in plant science*, 6, 352. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00352>

Joshi, R. (2018). A Review on *Colletotrichum* spp. Virulence Mechanism Against Host Plant Defensive Factors. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 6(6), 64-67. <https://doi.org/10.22271/plants.2018.v6.i6b.02>

Hamel, L. P., Nicole, M. C., Duplessis, S., & Ellis, B. E. (2012). Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *The Plant cell*, 24(4), 1327–1351. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.096156>

Howard, R. J., & Valent, B. (1996). Breaking and Entering: Host Penetration by the Fungal Rice Blast Pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual Review of Microbiology*, 50(1), 491-512. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.491>

Ishikawa, F. H., Souza, E. A., Shoji, J. Y., Connolly, L., Freitag, M., Read, N. D., & Roca, M. G. (2012). Heterokaryon Incompatibility is Suppressed Following Conidial Anastomosis Tube Fusion in a Fungal Plant Pathogen. *PloS one*, 7(2), e31175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031175>

Khan, A., & Hsiang, T. (2003). The Infection Process of *Colletotrichum graminicola* and Relative Aggressiveness on Four Turfgrass Species. *Canadian journal of microbiology*, 49(7), 433–442. <https://doi.org/10.1139/w03-059>

Kubo, Y. & Furusawa, I. (1986). Localization of Melanin in Appressoria of *Colletotrichum lagenarium*. *Canadian Journal of Microbiology*, 32(3), 280-282. <https://doi.org/10.1139/m86-054>

Liao, C. Y., Chen, M. Y., Chen, Y. K., Kuo, K. C., Chung, K. R., & Lee, M. H. (2012). Formation of Highly Branched Hyphae by *Colletotrichum acutatum* within the Fruit Cuticles of *Capsicum* spp. *Plant Pathology*, 6(2), 262-270. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2011.02523.x>

Lins, S. R. O., Alves, E., & Abreu, M. S. (2007). Estudos Histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em Plântulas de Cafeeiro. *Fitopatologia Brasileira*, 32(6), 488-495. <https://doi.org/10.1590/S0100-41582007000600006>.

Maia, F. G. M., Armesto, C., Zacan, W. L. A., Maia, J., & ABREU, M. S. (2011). Efeito da Temperatura no Crescimento Micelial, Produção e Germinação de Conídios de *Colletotrichum* spp. Isolados de Mangueira com Sintomas de Antracnose. *Bioscience Journal*, 27(2), 205-210. <http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/7581>

- Mendgen, K., & Hahn, M. (2002). Plant Infection and the Establishment of Fungal Biotrophy. *Trends in plant Science*, 7(8), 352–356. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(02\)02297-5](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(02)02297-5)
- Mota, S. F., Barcelos, Q. L., Dias, M. A., & Souza, E. A. (2016). Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. *Genetics and Molecular Research*, 15(2), 10.4238/gmr.15027176. <https://doi.org/10.4238/gmr.15027176>
- Nishihara, N. (1975). Two Types of Conidia of *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G. W. Wils. Formed on Artificial Media and their Pathogenicity. *Annual Phytopathology Society Japan*, 41(2), 171-175. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.41.171>
- Nordzieke, D. E., Sanken, A., Antelo, L., Raschke, A., Deising, H. B., & Pöggeler, S. (2019). Specialized Infection Strategies of Falcate and Oval Conidia of *Colletotrichum graminicola*. *Fungal Genetics and Biology*, 133, 103276. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103276>.
- Nunes, M. P., Souza-Paccola, E. A., Nobrega, G. M. A., & Paccola-Meirelles, L.D. (2010). Use of Oval Conidia as a Tool to Assess the Genetic Transfer among *Colletotrichum sublineolum* Mutants.. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53(1), 171-178. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132010000100021>
- O’Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., et al. (2012). Life Style Transitions in Plant Pathogenic *Colletotrichum* Fungi Deciphered by Genome and Transcriptome Analyses. *Nature Genetics*, 44, 1060-1065. <https://doi.org/10.1038/ng.2372>
- Pain, N. A., Green, J. R., Jones, G. L., & O’Connell, R. J. (1996). Composition and Organization of Extracellular Matrices around Germ-Tubes and Appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma*, 190, 119-130. <https://doi.org/10.1007/BF01281311>
- Panaccione, D. G., Vaillancourt, L. J., & Hanau, R. M. (1989). Conidial Dimorphism in *Colletotrichum graminicola*. *Mycologia*. 81(6), 876-883. <https://doi.org/10.2307/3760106>

Pande, S., Mughogho, L. K., Bandyopadhyay, R., & Karunaknr, R. I. (1991). Variation in Pathogenicity and Cultural Characteristics on Sorghum Isolates of *Colletotrichum graminicola* in India. *Plant Disease*, 75(8), 778-783. <https://doi.org/10.1094/PD-75-0778>.

Pereira, I. S., Abreu M. S. de; Alves E., & Ferreira, J. B (2009). Estudos Histopatológicos da Interação *Colletotrichum gloeosporioides* – Cafeeiro. *Bragantia*, 68(1), 117-123. <https://doi.org/10.1590/S0006-87052009000100013>

Prom, L. K., Perumal, R., Erpelding, J., Isakeit, T., Montes-Garcia, N., & Magill, C. W. A. (2009). Pictorial Technique for Mass Screening of Sorghum Germplasm for Anthracnose (*Colletotrichum sublineolum*) Resistance. *The Open Agriculture Journal*, 3(1), 20-25. <https://doi.org/10.2174/1874331500903010020>

Rhoden, S., Lucas, A., Evangelista, C., de Lima, F., Deprá, I., Nascimento, R., & Pamphile, J. (2019). Aspectos Físicos, Químicos e Genéticos na Interação Patógeno Planta Hospedeira. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 14(1), 34-41. <http://revista2.grupointegrado.br/revista/index.php/sabios2/article/view/1338>

Ribeiro, P. C. O., Machado Jr, R., Silva, R. A., & Santos, C. V. (2020). Híbridos Triplos: Antracnose do Sorgo sob Controle. *Campo & Negócio*, <https://revistacampoenegocios.com.br/hibridos-triplos-antracnose-do-sorgo-sob-controle/>

Roca, M. G., Davide, L. C., Davide, L. M. C., Mendes-Costa, M. C., Schwan, R. F., & Wheals, A.E. (2004). Conidial Anastomosis Fusion Between *Colletotrichum* Species. *Mycological Research*, 108(11), 1320-1326. <https://doi.org/10.1017/S0953756204000838>

Santos, L. V., Queiroz, M. V., Santana, M. F, Soares, M. A., Barros, E. G., Araújo, E. F., & Langin, T. (2012). Development of New Molecular Markers for the *Colletotrichum* Genus Using Retrocl1 Sequences. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 1087–1095. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0909-x>

Santos, G. R., Rodrigues, A. C., Bonifácio, A., Chagas Jr., A. F, & Tschoeke, P. H., (2014). Severidade de Antracnose em Folhas de Sorgo Submetido a Doses Crescentes de Silício. *Revista Ciência Agronômica*, 45(2), 403-408.

<https://doi.org/10.1590/S1806-66902014000200023>

Silva, D. D., Casela, C. R., Castro, H. A. de, Santos, F. G., & Ferreira, A.S. (2008). Diversidade Populacional de *Colletotrichum sublineolum* em Seis Localidades No Brasil. *Summa Phytopathologica*, 34(2), 149-155. <https://doi.org/10.1590/S0100-54052008000200007>.

Silva, D. D., Cota, L. V., da Costa, R. V., & Parreira, D. F. (2014). Principais Doenças do Sorgo. *Informe Agropecuário*, 35(278), 102-111.

da Silva, L. L., Alvarado-Moreno, H. L., Correia, H. L. N., Santana, M. F., & Queiroz, M. V. (2020). *Colletotrichum*: Species Complexes, Lifestyle, and Peculiarities of some Sources of Genetic Variability. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 1891–1904. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10363-y>.

Souza-Paccola, E. A., Favaro, L. C. L., Bomfeti, C. A., Mesquita, S. F. P., & Paccola-Meirelles, L. D. (2003a). Cultural Characterization and Conidial Dimorphism in *Colletotrichum sublineolum*. *Journal Phytopathology*, 151(7-8) 383-388. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00735.x>

Souza-Paccola, E. A., Fávaro, L. C. L., Casela, C. R., & Paccola-Meirelles, L. D. (2003b). Genetic Recombination in *Colletotrichum sublineolum*. *Journal Phytopathology*, 151(6), 329-334. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0434.2003.00727.x>

Souza-Paccola, E. A., Bomfeti, C. A., Tanaka, F. A. O., Junior, N. S. M., Colauto, N. B., Figueiredo, J. E. F., & Paccola-Meirelles, L. D. (2015). Novel Insights into the Early Stages of Infection by Oval Conidia of *Colletotrichum sublineolum*. *Scientia Agricola*, 72(4), 351–355. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-9016-2014-0409>

Stutts, L. R., & Vermerris, W. (2020). Elucidating Anthracnose Resistance Mechanisms in Sorghum-A Review. *Phytopathology Review*. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-04-20-0132-RVW>

Sutton, B. C. (1968). The Appressoria of *Colletotrichum graminicola* and *C. falcatum*. *Canadian Journal Botany*, 46(7), 873-876. <http://dx.doi.org/> <https://doi.org/10.1139/b68-115>

Thakur, R. P. & Mathur, K. (2000). Anthracnose. In: Frederiksen, R.A. & Odvody, G. (Eds.) *Compendium of Sorghum Diseases*. APS Press. St. Paul.

Vaillancourt, L. J. & Hanau, R. M. (1992). Genetic and Morphological Comparisons of *Glomerella (Colletotrichum)* Isolates from Maize and from Sorghum. *Experimental Mycology*, 16(3), 219-229. [http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975\(92\)90030-U](http://dx.doi.org/10.1016/0147-5975(92)90030-U)

Vargas, W. A., Martín, J. M. S., Rech, G. E., Rivera L. P., Benito, E.P., Díaz-Mínguez, J. M., Thon, M. R., & Sukno, S. A. (2012). Plant Defense Mechanisms are Activated During Biotrophic and Necrotrophic Development of *Colletotrichum graminicola* in maize. *Plant physiology*, 158 (3):1342-1358. <https://doi.org/10.1104/pp.111.190397>

Xavier, K. V., Pfeiffer, T., Parreira, D. F., Chopra, S., & Vaillancourt, L. (2017). Aggressiveness of *Colletotrichum sublineola* Strains from *Sorghum bicolor* and *S. halepense* to Sweet Sorghum Variety Sugar Drip, and their Impact on Yield. *Plant disease*, 101(9), 1578–1587. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1238-RE>

Wharton, P. S., & Julian, A. M. (1996). A Cytological Study of Compatible and Incompatible Interactions Between Sorghum Bicolor and *Colletotrichum sublineolum*. *New Phytologist*, 134(1), 25-34. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1996.tb01143.x>

Wharton, P. S., Julian, A. M., & O'Connell R. J. (2001). Ultrastructure of the Infection of *Sorghum bicolor* by *Colletotrichum sublineolum*. *Phytopathology*, 91(2), 149-158. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.2.149>

Wharton, P. S., & Schilder, A. C. (2008). Novel Infection Strategies of *Colletotrichum acutatum* on Ripe Blueberry Fruit. *Plant Pathology*, 57(1), 122-134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01698.x>

Wyatt, T. T., Wosten, H. A., & Dijksterhuis, J. (2013). Fungal Spores for Dispersion in Space and Time. *Advances in Applied Microbiology*, 85, 43-91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Edneia Aparecida de Souza-Paccola – 40%

Isadora Fernanda Sperandio – 10%

Walter Fernandes Meirelles– 10%

Giani Andrea Linde– 10%

Nelson Barros Colauto– 10%

Luzia Doretto Paccola-Meirelles – 20%