



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
CURSO DE GRADUAÇÃO - AGRONOMIA

JULIANA ARAUJO DA SILVA

**APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NA
CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO DE *Colletotrichum* EM
FOLHAS DE CLONES DE CAJUEIRO**

FORTALEZA

2023

JULIANA ARAUJO DA SILVA

**APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NA
CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO DE *Colletotrichum* EM
FOLHAS DE CLONES DE CAJUEIRO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Agronomia do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade Federal
do Ceará como requisito parcial para a obtenção
do título de Engenheira Agrônoma.

Orientador: Prof.º Dr.º Cristiano Souza Lima

Coorientadora: Draª Celli Rodrigues Muniz

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S58a Silva, Juliana Araújo da.
Aplicação da Microscopia Eletrônica de Varredura na Caracterização do Processo Infeccioso de Colletotrichum em Folhas de Clones de Cajueiro / Juliana Araújo da Silva. – 2023.
49 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Agronomia, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Cristiano Souza Lima.
Coorientação: Profa. Dra. Celli Rodrigues Muniz.
1. Epidemiologia. 2. Microscopia eletrônica de varredura. 3. Antracnose do cajueiro. I. Título.
CDD 630
-

JULIANA ARAUJO DA SILVA

**APLICAÇÃO DA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA NA
CARACTERIZAÇÃO DO PROCESSO INFECCIOSO DE *Colletotrichum* EM
FOLHAS DE CLONES DE CAJUEIRO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação em Agronomia do Centro
de Ciências Agrárias da Universidade Federal
do Ceará como requisito parcial para a obtenção
do título de Engenheira Agrônoma.

Aprovada em 28/06/2023

BANCA EXAMINADORA

Profº Drº Cristiano Souza Lima (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Analista A - Draº Celli Rodrigues Muniz (Coorientadora)
EMBRAPA Agroindústria Tropical

Pesquisador Drº Marlon Vagner Valentim Martins
EMBRAPA Agroindústria Tropical

Pesquisadora Me. Regimara Francisca Bernardo da Silva Vieira
Dpto. de Fitotecnia - Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me dar sabedoria para trilhar os meus caminhos, por me colocar cercada de pessoas maravilhosas durante minha caminhada, por me dar forças em meio às adversidades e por me amar incondicionalmente.

Aos meus pais, Eliene e Getúlio, por me proporcionarem todas as condições necessárias para que eu pudesse ter oportunidade de escolher quem eu quero ser como pessoa e profissional. Agradeço por todo amor, dedicação, apoio emocional, psicológico, financeiro e espiritual.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), pela gratuidade e qualidade do ensino prestado e à EMBRAPA Agroindústria Tropical, pela concessão da bolsa de estágio e pela oportunidade da realização do meu experimento de TCC.

Aos meus orientadores Prof^o Dr.^o Cristiano Souza Lima pela orientação, disponibilidade e ensino prestado durante a minha graduação. E à Dra^a Celli Rodrigues Muniz, minha coorientadora e supervisora de estágio, pela oportunidade, paciência, confiança, disponibilidade, excelente orientação e por embarcar comigo nesta corrida contra o tempo. Agradeço por ter sido mais que uma mentora, e sim, uma verdadeira educadora.

Aos meus familiares que sempre me apoiaram e me incentivaram durante esta trajetória, minhas tias Rosa Maria, Carmem Célia, Mirtes, meus tios Pedro e Ribamar. *In memoriam*, meus tios Marcos Aurélio, Marcos Flávio, Berenice, a minha querida avó Laura, por sua doçura, bondade, apoio incondicional, e a meu avó Pedro.

À minha irmã, Luana, minha melhor amiga para todas as horas.

Às minhas primas Fernanda, Daniele, Vitória e Renata, por todo apoio e parceria.

Ao meu companheiro, Ícaro, por todo amor, incentivo, força e apoio.

À minha sogra, Rosemeire, e cunhada, Carolina, por todas as orações.

Aos responsáveis pelo laboratório de fitopatologia da EMBRAPA, Samara e Dr^o Marlon, por toda paciência, disponibilidade e colaborações. E aos amigos que fiz durante meu estágio na EMBRAPA, obrigada por toda colaboração, apoio, reflexões, críticas e sugestões recebidas, Gisele, Sabrina, Karla, Gabriela, Pedro e Fabiana. Em especial a Regimara por tanta delicadeza ao repassar seus conhecimentos, sempre disposta a tirar minhas dúvidas e pelo grande aconselhamento em cada etapa do meu trabalho.

Ao professor Dr.º Ismail Soares, pelo convite ao laboratório de nutrição mineral e por despertar meu interesse pela pesquisa. E aos colegas do laboratório de nutrição mineral de plantas por toda colaboração.

Ao meu orientador de estágio e coordenador do curso de agronomia, professor Dr.º Julius Blum, por toda a disponibilidade. E aos demais professores do corpo docente de agronomia da UFC pelo empenho em educar.

À prefeitura da minha cidade, Eusébio, pelo transporte universitário gratuito prestado que permitiu o meu acesso à universidade todos os dias.

Aos meus grandes amigos da graduação, que tornaram a lida universitária mais leve, divertida, e por incontáveis trocas de conhecimento. Em especial a minha grande amiga pessoal e Engenheira Agrônoma, Ingrid Karen, por toda cumplicidade e conhecimento compartilhado.

Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade.

Marie Curie

RESUMO

O cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) é uma planta tropical e atualmente dispersa em todo o território brasileiro. É de suma importância socioeconômica para o país, gerando emprego na indústria e no campo. Contudo, a produtividade dessa cultura apresenta limitações, dentre elas a ocorrência de doenças, tendo a antracnose como destaque em potencial infeccioso para uma ampla gama de plantas frutíferas tropicais, sendo uma das principais doenças presentes nos pomares de cajueiro. A antracnose pode ocorrer em qualquer fase do desenvolvimento das plantas, causando grandes prejuízos. Portanto, para compreender o processo infeccioso do agente etiológico da antracnose, em cultivares comerciais de cajueiro, é importante entender como ocorre todo o ciclo da doença nas plantas. Neste sentido, a microscopia eletrônica de varredura (MEV) surge como uma relevante ferramenta utilizada na observação e caracterização de patossistemas fúngicos. Neste trabalho a MEV vem elucidar o processo de infecção foliar na antracnose do cajueiro, através da caracterização da microestrutura do fungo e dos danos e injúrias ocasionados por ele no tecido do hospedeiro. Para isso, foram inoculados dois isolados monospóricos de *Colletotrichum*, LF 200 e LF 201, em discos de folhas de três genótipos de cajueiro CCP 09, CCP 73 e BRS 226, por suspensão de esporos na concentração de $2,1 \times 10^6$ esporos/mL, no intervalo de tempo de 0 horas a 144 horas. Nos resultados, observou-se a formação de estruturas reprodutivas, estruturas de absorção de nutrientes, estruturas de fixação, germinação, e estruturas de infecção primárias e secundárias. Foi constatado que os isolados utilizam aberturas naturais para colonizar os tecidos internos do hospedeiro, bem como por punção pontual por meio dos apressórios. Também foi possível observar a diferença do êxito da colonização e infecção dos isolados do fungo em genótipos resistentes. Para melhor compreensão ainda é necessário realizar a identificação dos isolados em nível de espécie.

Palavras-chave: Epidemiologia. Microscopia eletrônica de varredura. Antracnose do cajueiro.

ABSTRACT

The cashew tree (*Anacardium occidentale* L.) is a tropical plant and is currently dispersed throughout Brazil. It is of great socioeconomic importance for the country, generating employment in industry and in the countryside. However, the productivity of this crop has limitations, among them, the occurrence of diseases, such as anthracnose, which has important infectious potential for a wide range of tropical fruit plants, being the main disease present in cashew orchards. Anthracnose can occur at any stage of plant development, causing severe damage. Therefore, in order to understand the infection process of the etiologic agent of anthracnose in commercial cashew cultivars, it is important to understand how the entire cycle of the disease occurs in plants. In this way, the scanning electron microscopy (SEM) emerges as a relevant tool used in the observation and characterization of fungal pathosystems. In this work the SEM comes to elucidate the foliar infection process of anthracnose of the cashew tree, through the characterization of the microstructure of the fungus and the damage and injuries caused by it in the host tissue. For this, two monosporic isolates of *Colletotrichum*, LF 200 and LF 201, were inoculated in leaf discs of three cashew genotypes CCP 09, CCP 73 and BRS 226, by means of spore suspension 2.1×10^6 spores/mL, in the time range from 0 hours to 144 hours. The results showed the formation of reproductive structures, nutrient absorption structures, fixation structures, germination, and primary and secondary infection structures. It was found that the isolates use natural openings to colonize the host's internal tissues, as well as punctual puncture through appressoria. It was also possible to observe the difference in the success of colonization and infection of isolates of the fungus in resistant genotypes. For a better understanding, it is still necessary to identify the isolates at the species level.

Keywords: Epidemiology, Scanning electron microscopy, Cashew anthracnose.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Sintomas característicos da antracnose nas folhas do cajueiro.....	19
Figura 2. Ciclo de vida do <i>Colletotrichum</i>	21
Figura 3. Fotografias de microscópio óptico com aumento de 630x dos isolados de <i>Colletotrichum sp.</i>	23
Figura 4. Fotografias do isolado LF 200 de microscópio óptico.....	24
Figura 5. Fotografias do isolado LF. 201 em microscópio óptico.....	25
Figura 6. Processamento das amostras.	27
Figura 7. Discos Testemunhas 144 HAI.....	29
Figura 8. Eletromicrografias do genótipo BRS 226 144 HAI.	30
Figura 9. Eletromicrografias do genótipo CCP 76 144 HAI.	30
Figura 10. Eletromicrografia do genótipo CCP 09 144 HAI.....	31
Figura 11. Discos de genótipo CCP 76 24 HAI	31
Figura 12. Eletromicrografias do genótipo CCP 76 24 HAI.....	32
Figura 13. Genótipo CCP 09 24 HAI	32
Figura 14. Genótipo BRS 226 24 HAI	33
Figura 15. Eletromicrografia de genótipo CCP 09 24 HAI inoculado com o isolado LF 200	34
Figura 16. Eletromicrografia de genótipo BRS 226 24 HAI inoculado com o isolado LF 200	34
Figura 17. Tubos germinativos foram formados 24 e 72 HAI com o isolado LF 200, nos genótipos CCP 09, BRS 226 e CCP 76	35
Figura 18. Formação de tubos germinativos 24 HAI com o isolado LF 201 no genótipo CCP 76.....	36
Figura 19. Apressórios de genótipo CCP 76 com o isolado LF 201 24 HAI e LF 200 72 HAI.	37
Figura 20. Apressórios em genótipos CCP 09 e BRS 226 inoculados com o isolado LF 200.	37
Figura 21. Massa alaranjada sobre superfície foliar de genótipo BRS 226 indicando estruturas reprodutivas de <i>Colletotrichum</i>	38
Figura 22. Estruturas reprodutivas.....	39
Figura 23. O comportamento do genótipo BRS 226 em relação aos isolados LF 200 e 201...	40

Figura 24. Discos de folha de genótipo CCP 09.....	41
Figura 25. Tecidos internos do genótipo CCP 09 inoculado com o isolado LF 200.....	41
Figura 26. CCP 76 72 HAI.	42
Figura 27. Aglomerado de glândulas em genótipo BRS 226.	43
Figura 28. Genótipo CCP 09 inoculado com o isolado LF 201.	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 As características biológicas e morfológicas dos fungos	16
3.2 O gênero <i>Colletotrichum</i> e a antracnose	18
3.3 O processo infeccioso de <i>Colletotrichum</i>	20
4 METODOLOGIA	22
4.1 Coleta do Material Vegetal	22
4.2 Os isolados de <i>Colletotrichum</i>	22
4.3 Avaliação da expressão da doença	25
4.4 Coleta das Amostras e Processamento para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Testemunhas	29
5.2 Sintomas nos discos de folhas 24 HAI	31
5.3 Estruturas de fixação	35
5.3.1 <i>Tubos germinativos</i>	35
5.3.2 <i>Apressórios</i>	36
5.4 Estruturas reprodutivas	38
5.5 A agressividade da antracnose	39
6 CONCLUSÕES	46
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1 INTRODUÇÃO

O cajueiro (*Anacardium occidentale L.*) é uma planta alógama, tropical, perene, pertencente à família Anacardiaceae e ao gênero *Anacardium*. Originária da região litorânea do Brasil, e atualmente está dispersa em todo o território do país. Os seus maiores centros de diversidade se encontram na região Amazônica e no Cerrado brasileiro (BARROS, PAIVA, CAVALCANTE, 1999).

A cajucultura é de suma importância socioeconômica no país, gerando empregos na indústria e no campo, tendo como principal produto comercial a amêndoa da castanha, seguida do pseudofruto, o caju. Sua produção para fins comerciais é mais fortalecida na região Nordeste, sendo o Ceará um dos principais produtores do mundo. (BRAINER, 2022).

Contudo, a produtividade desta cultura apresenta limitações, dentre elas a ocorrência de fitomoléstias, tendo a antracnose como destaque em potencial infeccioso para uma ampla gama de plantas frutíferas tropicais, sendo uma das principais doenças presentes nos pomares de cajueiro. Também considerada um dos maiores problemas fitossanitários em todo o mundo. O prejuízo para as plantas é a de um retardo no seu desenvolvimento, uma vez que, ao danificar as folhas, compromete a fotossíntese. A antracnose pode ocorrer em qualquer fase de desenvolvimento das plantas, inclusive pós-colheita, causando perdas significativas na produtividade (VELOSO, *et al.*, 2022).

Em brotos jovens a antracnose causa escurecimento e deformações, já em órgãos mais maduros, os sintomas são de lesões de coloração marrom-avermelhadas. Nas flores, a antracnose causa manchas escurecidas nas hastes das panículas, assim como nos maturis e pedúnculos. Os frutos podem rachar conforme a severidade da doença (MARTINS, *et al* 2020).

Para compreender o processo de patogenia da antracnose, em cultivares comerciais de cajueiro, é importante entender como ocorre o ciclo da doença nas plantas. E diante da elevada importância, êxito econômico e sociocultural da cajucultura, a microscopia eletrônica (MEV) surge como uma relevante ferramenta utilizada na observação e caracterização de patossistemas fúngicos. Fornecendo imagens tridimensionais com grandes aumentos de superfícies em diversos materiais, inclusive biológicos. A microscopia eletrônica de varredura permite a investigação detalhada de processos infecciosos em níveis celular e tecidual, temporalmente, esclarecendo fenômenos de infecção, distribuição e localização interna de

patógenos. Possibilita análises visuais tridimensionais das mudanças impelidas pelos microrganismos em amostras de interesse, bem como o acompanhamento do funcionamento dos microrganismos em materiais biológicos, incluindo o seu completo processo reprodutivo. O que não seria possível por meio de outras técnicas, a exemplo da microscopia óptica (TANAKA, 2016).

Os estudos que envolvem análise por MEV na caracterização morfológica do processo infeccioso de um patossistema fúngico em espécimes de cajueiro ainda são raros. O pouco que se encontra está comumente relacionado a outros patógenos, tais como o oídio, míldio, entre outros.

Cita-se como exemplo, o trabalho realizado por Pinto (2016), que apresenta a tolerância de onze (11) clones de cajueiro comerciais ao oídio, em três ciclos produtivos. Em seguida, amostras de folhas e flores foram colhidas e submetidas à MEV, com intuito de se estudar a morfologia do processo infeccioso do oídio. E por fim, foi testado uma metodologia de inoculação natural de oídio para seleção precoce de clones de cajueiro. Observaram-se nas inflorescências de quase todos os clones, aglomerados de conidióforos dispostos em paralelo ou entre as sépalas, nas folhas, houve confirmação de micélio recobrando toda a superfície foliar, onde detectaram-se apressórios bem desenvolvidos, de diferentes formatos, transpassando a epiderme das folhas. No clone BRS 189, as folhas foram alastradas com micélio e conidióforos do patógeno. Nas sépalas o fungo investiu no desenvolvimento reprodutivo. Já nos órgãos vegetativos, sem sintomas, o fungo apresentou sua estrutura desenvolvida, o que foi considerado um marco importante na detecção precoce da doença. Ou seja, a partir de um monitoramento por meio da análise microscópica de amostras oriundas dos pomares, é possível atestar a presença da doença, embora a planta não apresente sintomas aparentes (PINTO, 2016).

Outro exemplo encontrado na literatura, foi o trabalho realizado por Curvelo *et al.* (2010), que estudou o processo infeccioso de *Ramularia areola*, que é o agente causal da ramulária em folhas de algodoeiro, por meio de MEV. Neste trabalho, folhas de algodoeiro cultivar Nu-Opal em estágio V₄, foram inoculadas com suspensão de esporos de concentração $1,5 \times 10^5$ conídio/mL de *R. areola*, e amostras dessas folhas foram coletadas 12 horas, 12 e 22 dias após a inoculação. Foi realizado em cada coleta o preparo das amostras para observação em MEV, onde foi observado a germinação dos conídios de *R. areola*, sem a formação de apressórios, com maioria emitindo dois tubos germinativos, em direção aos estômatos, com finalidade de penetrar as folhas da planta. O parasitismo ocorreu tanto inter como

intracelularmente, no mesófilo foliar, e a esporulação ocorreu por meio dos estômatos nas duas faces das folhas.

Observa-se assim, que avaliações microscópicas por MEV podem ser fundamentais para o entendimento de distintos patossistemas fúngicos em culturas de relevância agrônômica. O presente trabalho vem adicionar luz ao conhecimento existente relacionado à antracnose do cajueiro. Com a caracterização morfológica em dimensões microestruturais da antracnose do cajueiro, relacionada com os sintomas visíveis a olho nu em discos de folhas, ainda não havia sido realizada. Portanto, por meio da observação das imagens oriundas de MEV, este trabalho busca compreender o processo infeccioso da antracnose em em discos de folhas de clones de cajueiro já conhecidos da literatura. Que apresentam atributos de suscetibilidade à antracnose, como o CCP 09 e resistência, tais como o CCP 76 e BRS 226, infectados *in vitro* e acompanhados ao longo do tempo. Através da caracterização da microestrutura do fungo e dos danos e injúrias ocasionados por ele no tecido do hospedeiro.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar morfológicamente o processo infeccioso de dois isolados de fungos do gênero *Colletotrichum* inoculados em discos de folhas de cajueiro, pertencentes aos clones CCP 09, CCP 76 e BRS 226 ao longo do tempo.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar microestruturalmente o processo infeccioso do fungo *Colletotrichum* em folhas de cajueiro utilizando a microscopia eletrônica de varredura;
- Documentar temporalmente com eletromicrografias as estruturas de deposição, colonização, e infecção do fungo *Colletotrichum* em folhas de cajueiro;
- Determinar diferenças no comportamento dos clones de cajueiro em relação aos isolados LF 200 e LF 201.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1. As características biológicas e morfológicas dos fungos

Os fungos estão presentes em todo o planeta, fazendo parte da microbiota natural de inúmeros organismos vivos (animais, vegetais), ou da atmosfera e, nas águas de mares, rios, lagos, no solo, etc. Pertencem ao reino Eukaryota, e podem ser unicelulares ou pluricelulares. Com dimensões variadas, de formatos macroscópicos a exemplo dos cogumelos e microscópicos, tais como as leveduras e bolores filamentosos, que por sua vez, representam a maioria das espécies. Esses filamentos, denominados hifas, quando se encontram em densos aglomerados, dão origem ao micélio. Sua parede celular é desprovida de plastos ou pigmentos e são compostos de quitina e α -glucano. Suas hifas podem ser apocíticas ou septadas, e cenocíticas ou asseptadas. Sendo os septos as paredes porosas presente entre as hifas septadas, que permitem a troca de meio e organelas (TORTORA, FUNKE; CASE, 2017).

A reprodução de grande parte dos fungos divide-se em anamorfos (realizam apenas reprodução assexuada) e teleomorfos (realizam apenas reprodução sexuada). E em geral, ocorre pela formação de esporos ou conídios, podendo ser de modo sexual ou assexual respectivamente. Que germinam ao se depararem com situação favorável de umidade e calor, formando tubos germinativos, ramificados em várias direções, dando origem a um novo micélio. Para que os conídios ou esporos se propaguem no meio, é necessário que tenham acesso ao ar, para isso, ocorre uma verticalização de algumas hifas sobre o micélio, representando a estrutura reprodutiva dos fungos, chamado esporóforo ou conidióforo, originando os esporos e conídios. Estes podem ser formados isoladamente ou em agrupamentos, que constituem os conidiomas. Já os esporos são formados em ascomas ou basidiomas, a depender da classe do fungo (MORAES, PAES e HOLANDA, 2009).

Os esporos sexuais são resultantes da meiose, sendo haplóides (ascósporos ou basidiósporos). Os ascósporos formam-se no interior dos ascos, em número de oito por asco. Geralmente, são produzidos em corpos de frutificação, tais como o cleistotécio, peritécio, apotécio e ascostroma. Os esporos assexuais podem resultar de divisões celulares durante o ciclo de vida do fungo, pode ser de diferentes tipos, tais como, zoósporos, aplanósporos, conídios e clamidósporos. Os conídios são formados a partir de células conidiogênicas, localizadas em hifas que sofreram diferenciação, os conidióforos livres ou em corpos de

frutificação: picnídios ou acérvulos. Os conídios também podem ser formados a partir de segmentação e fragmentação do talo micelial do fungo (KRUGNER e BACCHI, 1995).

Os fungos são microrganismos heterotróficos, se alimentam através da absorção de água e nutrientes minerais ou orgânicos a partir do meio onde crescem. Por meio da liberação da exoenzima, que auxilia na digestão dos nutrientes. Em geral, podem ter hábitos saprofitos, obtendo alimento a partir da decomposição de outros organismos mortos; parasitas, alimentando-se a partir de substâncias vivas; simbiontes, tais como os líquens; e, predadores, capturando pequenos animais (MORAES, PAES e HOLANDA, 2009).

Os fungos fitopatogênicos podem ser classificados em parasitas obrigatórios, que são aqueles que vivem apenas do tecido vivo do hospedeiro, não havendo possibilidade de cultivá-los em meios de cultura. Entre eles estão os fungos causadores de ferrugens, carvões, oídio e míldio. Há também os parasitas facultativos, que podem sobreviver parasitando organismos vivos ou sobreviver de matéria orgânica morta, tais como os fungos *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani*. Já os saprófitas facultativos são aqueles que podem viver grande parte do tempo sobrevivendo de modo a parasitar o hospedeiro ou podem sobreviver em função apenas de restos de matéria orgânica morta. Tem-se como exemplo de fungos saprófitas facultativos, alguns fungos fitopatogênicos como *Alternaria spp.*, *Colletotrichum spp.* e *Cercospora spp.* (MICHEREFF, 2001).

Segundo MORAES, *et al.*, (2009) o reino Fungi é dividido em sete filos, sendo estes Chytridiomycota, Neocallimastigomycota, Blastocladiomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota. Sendo o filo Ascomycota o maior grupo do reino Fungi, onde se encontram 75% de todos os fungos descritos. São encontrados como organismos saprófitos, parasitas ou associados, no qual está presente o *Colletotrichum*, patógeno estudado neste trabalho.

A taxonomia tem sido baseada em características relacionadas à morfologia e citologia. Embora, atualmente, outras técnicas tenham sido utilizadas para a identificação dos fungos, entre essas se encontra o PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), sequenciamento de DNA, entre outras.

3.2 O gênero *Colletotrichum* e a antracnose

No Brasil, a antracnose foi relatada pela primeira vez para a cajucultura em 1948, conhecida popularmente como "queima de cajueiro" (ROSSETTI, 1948). A antracnose pode ser observada em pomares com grande variabilidade genética, plantios comerciais e inclusive em espécies silvestres (ROSSETTI (1948) *apud* VELOSO, *et al.* 2022).

O Brasil possui a 6ª maior área de castanha colhida do mundo, sendo a região Nordeste o destaque neste setor, com mais 99% da produção. Entretanto, o Ceará que comporta 63,5% da produtividade de castanha no Brasil, teve decréscimo de 32,6% nos anos de 2012 a 2019, devido a ocorrência de pragas e doenças, tais como mosca branca, oídio e antracnose. As perdas de produtividade devido à antracnose podem ser superiores a 40% na indústria e no campo (BRAINER, 2022).

Sua ocorrência pode afetar diversos órgãos jovens da planta tais como ramos, faces adaxial e abaxial das folhas, flores, frutos e pedúnculos. Vale ressaltar que os fungos fitopatogênicos conseguem penetrar qualquer tecido da planta de modo direto por meio de "força mecânica" ou através da exsudação de enzimas; e indireto, por meio de aberturas naturais ou ferimentos no tecido vegetal, em qualquer fase de desenvolvimento (VELOSO, *et al.*, 2022).

A antracnose é uma doença ocasionada devido ao complexo de espécies do gênero *Colletotrichum* (VELOSO, *et al.*, 2017). Pertence ao filo Ascomycota, classe Sordariomycetes e ordem Glomerellales (LIU, *et al* 2022). É o único gênero da família das Glomerellaceae. E está presente em diversas regiões do mundo; e ao associar-se a um hospedeiro suscetível, aliado a um ambiente favorável, tais como locais com alta umidade, temperaturas médias a altas (temperatura ótima entre 20 a 30°C), em plantio adensado, com presença de restos culturais contaminados ou com presença de hospedeiros secundários; constituem-se em um perfeito cenário para o desenvolvimento da doença. A sua disseminação no pomar pode se dar pelas águas das chuvas, pelas águas de irrigação e pelo vento (MENEZES, 2006).

Figura 1. Sintomas característicos da antracnose nas folhas do cajueiro.



Fonte: Dr.º Marlon Vagner Valentim Martins, pesquisador/EMBRAPA.

A e B - Plantas com sintomas da antracnose.

Segundo a classificação proposta por George L. McNew (1960), com base no processo fisiológico de interferência do patógeno, a antracnose está inserida no grupo V; o grupo de doenças que prejudicam a fotossíntese, pois causam manchas e crestamentos (MICHEREFF, 2001).

Os sintomas de antracnose nas folhas podem ser vistos facilmente, expressos por meio de lesões de cor parda variando até marrom-avermelhada conforme amadurecem, de formato irregular, e são mais frequentes em folhas jovens e tenras. Em casos de ataque severo as folhas podem ficar deformadas, com aparência de requeima, inclusive nas brotações. Nos pedicelos as manchas podem ter formato circular com ou sem presença de goma. Já nas panículas as manchas podem aparecer de forma contínua e extensa. O maturi pode apresentar-

se escurecido e com rachaduras, bem como nas castanhas (MARTINS, CARDOSO & VIANA, 2016).

Atualmente o manejo da doença nos pomares consiste no afastamento das plantas, para evitar que o adensamento possa contribuir no aumento da umidade, eliminação de restos culturais, e pulverizar fungicidas registrados para a cultura pelo Ministério da Agricultura (MARTINS, CARDOSO & VIANA, 2016). As pulverizações para o controle da doença devem ser realizadas logo após ao período chuvoso ou após a “chuva do caju” e durante o período de floração.

Entre os produtos indicados e mais utilizados para o combate da antracnose de maneira profilática estão substâncias à base de oxiclreto de cobre, azoxistrobina (estrobilurina) associada a difenoconazol (triazol), difenoconazol (triazol). Os produtos estão disponíveis no mercado com as devidas formulações, pó molhável, suspensão concentrada (SC) e concentrado emulsionável (EC) (AGROFIT, 2023).

Outra alternativa para satisfazer as exigências do mercado consumidor, é a utilização de cultivares resistentes. Portanto, o melhoramento genético vegetal tem sido essencial para a viabilização da cajucultura, por meio da geração de exemplares melhorados, que possibilitam frutos de maior qualidade e árvores mais resistentes a pragas e doenças.

3.3 O processo infeccioso de *Colletotrichum*

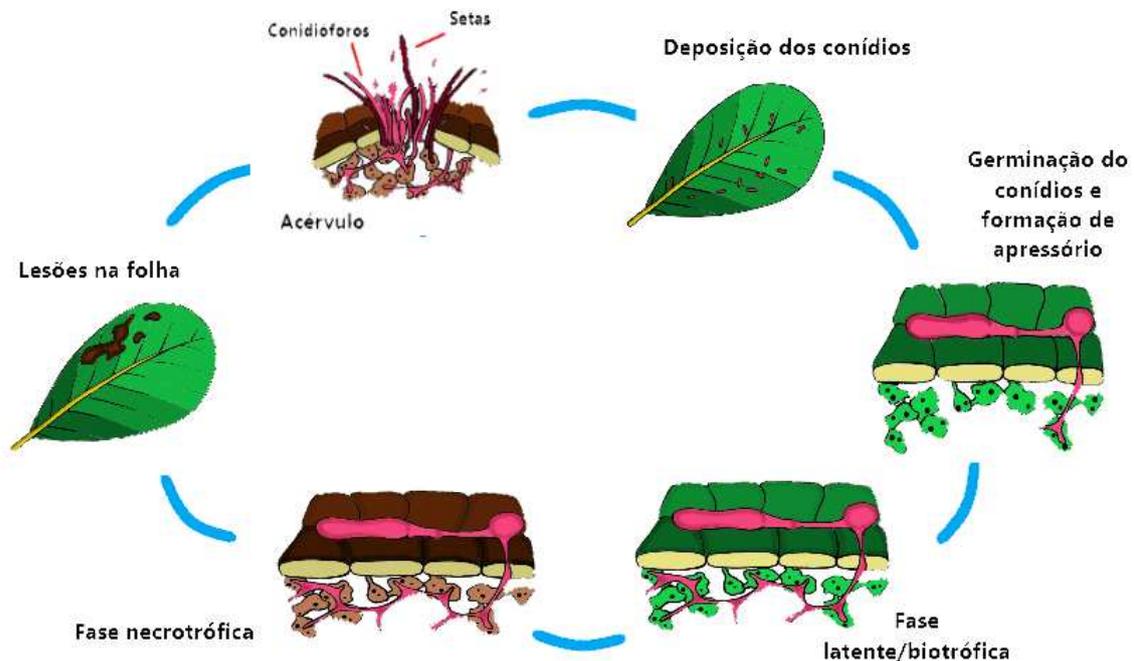
Em geral, o processo infeccioso das espécies de *Colletotrichum* se dá primeiramente por meio da deposição de conídios na superfície do hospedeiro por diversas vias, seja pela água, vento, entre outras formas. Como citado na tese de Carvalho (2016), a fixação do patógeno ocorre por meio da germinação dos conídios, que por sua vez, dão origem a tubos germinativos, este após septação, diferencia-se e forma uma estrutura intumescida, melanizada, de formato globoso, conhecida como apressório; esta permite a fixação do patógeno na superfície do tecido. Na sequência, se dá a penetração, que pode ocorrer por meio de aberturas naturais, tais como os estômatos, ferimentos pré-existentes ou diretamente através da epiderme. O apressório exerce uma forma de pressão pontual na cutícula do tecido, o que pode acarretar uma abertura por meio de força mecânica ou química, mediante enzimas. Uma vez que a penetração é bem-

sucedida, ocorre a colonização do patógeno nos tecidos, e dá-se início a relação parasitária do fungo no tecido do hospedeiro. Vale ressaltar que o êxito deste processo varia conforme as condições do ambiente.

Após a penetração, o patógeno permanece de modo latente dentro dos tecidos desenvolvendo-se endofiticamente, intra ou intercelularmente. O desenvolvimento de hifas no parênquima e o seu estabelecimento nas áreas adjacentes, ocasiona lesões internas, resultando na morte das células, e conseqüentemente no aparecimento dos sintomas (VELOSO, 2022).

A antracnose é uma doença cíclica, e após vasta contaminação com formação de micélio, há o rompimento da cutícula do hospedeiro, neste momento há o surgimento dos acérvulos com a produção de conídios em conidióforos, sendo estes a fonte secundária de inóculos da doença. Esta produção de estruturas de resistência é constante, dando origem consecutivamente a novas infecções (SOARES, 2019; VELOSO *et al*, 2022).

Figura 2. Ciclo de vida do *Colletotrichum*.



Arte - Luana Araújo da Silva (2023).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta do Material Vegetal

Este estudo foi desenvolvido em amostras de tecido foliar de três clones comerciais de cajueiro. Sendo o clone CCP 09 conhecidamente suscetível e os clones CCP 76 e BRS 226 resistentes à antracnose.

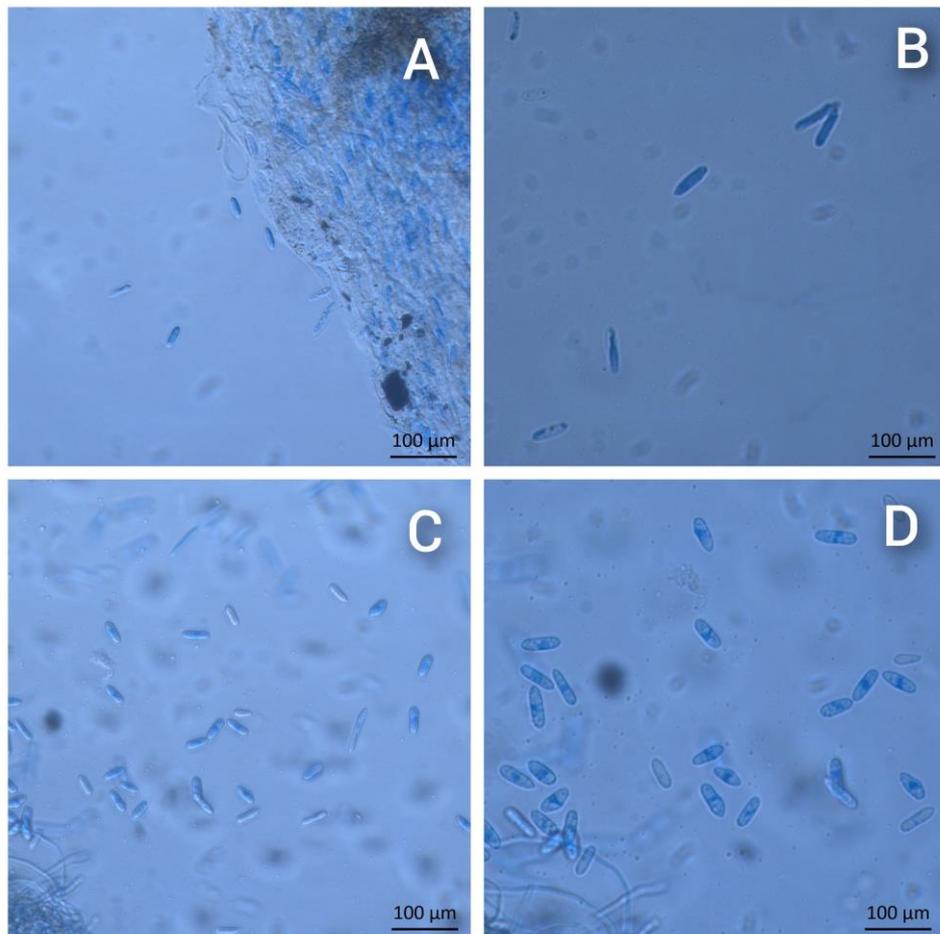
As mudas utilizadas foram obtidas do Campo Experimental da Embrapa Agroindústria Tropical em Pacajus. Para a condução do experimento, as amostras foram então levadas para a Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, Ceará, onde permaneceram em casa de vegetação.

As mudas foram obtidas durante o primeiro semestre do ano de 2023, época favorável ao desenvolvimento da doença. De cada muda coletaram-se folhas intermediárias, evitando-se utilizar folhas demasiadamente jovens, para que o tecido foliar durasse mais tempo em ágar; e evitando também folhas muito velhas, já que o patógeno tem preferência por folhas mais tenras.

4.2 Os isolados de *Colletotrichum*

Neste trabalho utilizou-se dois isolados de *Colletotrichum sp.* da coleção de microrganismos do laboratório de fitopatologia da EMBRAPA Agroindústria Tropical. Os isolados, codificados como LF. 200 e LF. 201, são oriundos do campo experimental da EMBRAPA em Pacajus. Para a realização do experimento, após a purificação dos isolados, as culturas foram submetidas ao cultivo monospórico que consistiu no isolamento e cultivo dos fungos a partir de um único esporo. Logo após o crescimento dos fungos nas primeiras placas após o isolamento monospórico, estes foram novamente preservados pelo método Castellani.

Figura 3. Fotografias de microscópio óptico com aumento de 630x dos isolados de *Colletotrichum*.

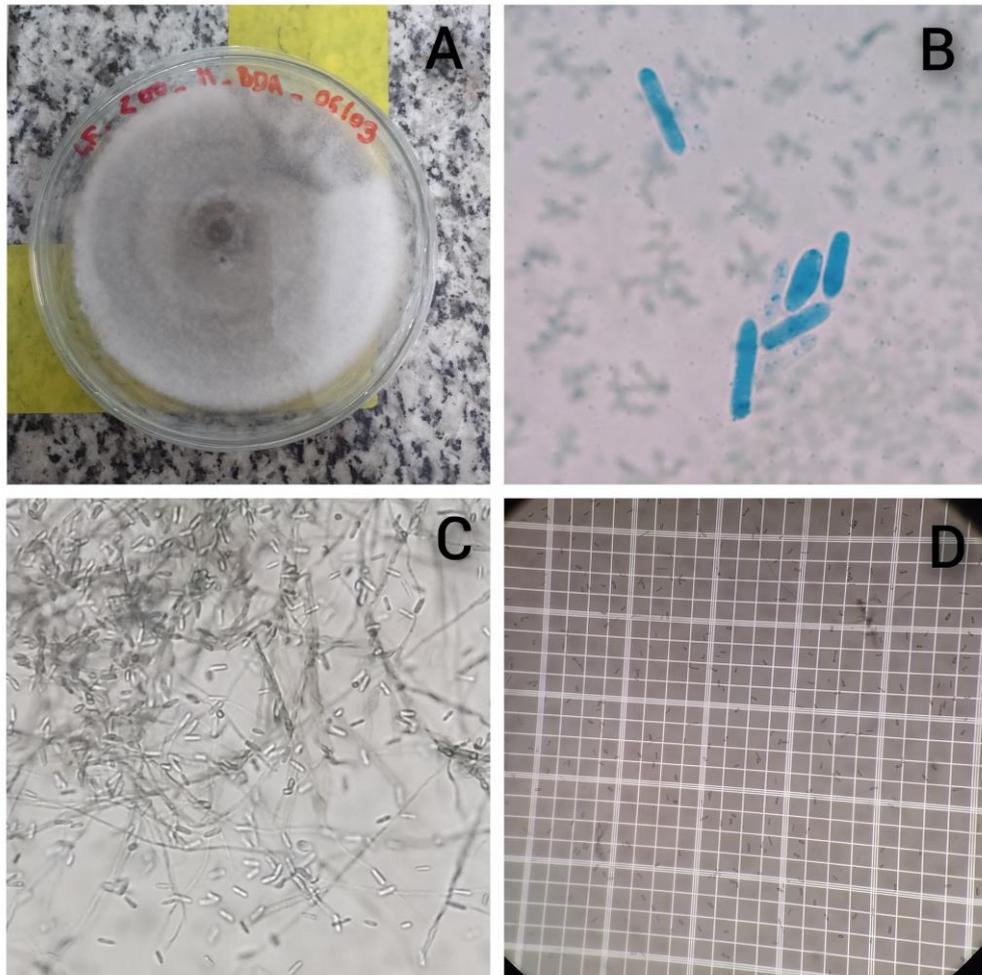


. Fonte: de própria autoria (2023).

A e B -Conídios do isolado LF. 200 corados com Azul de Amann. **C e D** - Conídios do isolado LF. 201 corados com Azul de Amann.

Os isolados LF. 200 e LF. 201 foram identificados como *Colletotrichum*., pelas características morfológicas de suas colônias tais como coloração variando de acinzentado a branco e preto, massa de esporos alaranjada, micélio de aspecto cotonoso e denso (LF.200) ou rente ao meio de cultura (LF.201). Conidióforos simples, conídios hialinos, de formato cilíndrico, e hifas septadas. Durante a realização do experimento, os fungos isolados foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), com sucessivas repicagens a cada doze dias.

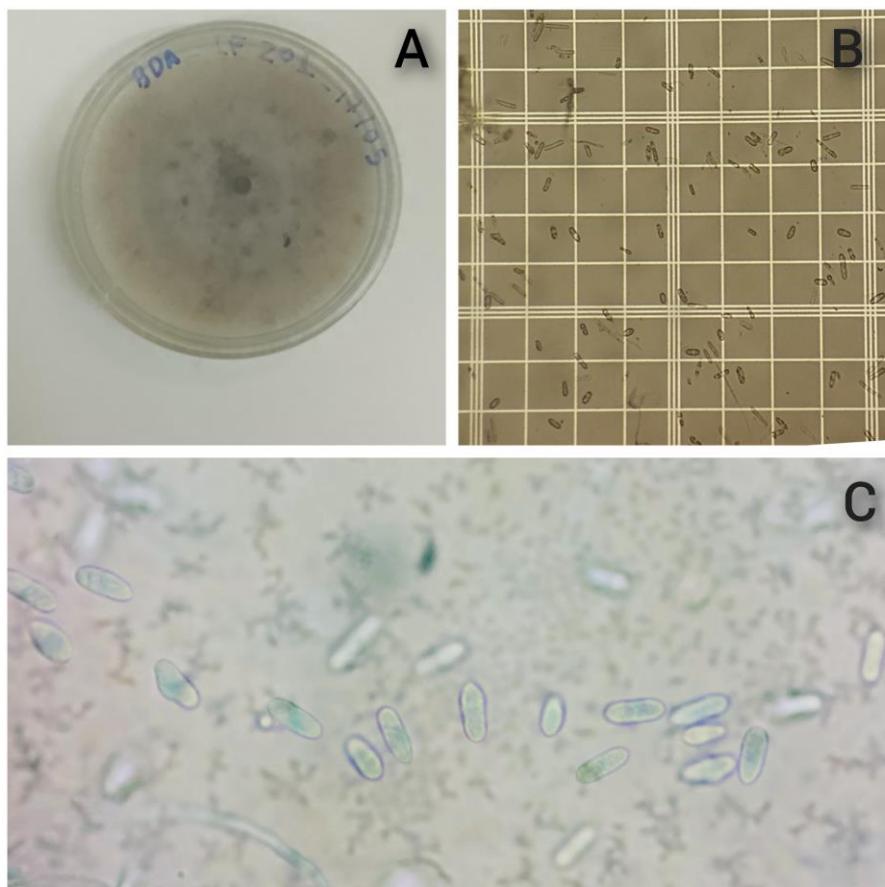
Figura 4. Fotografias do isolado LF 200 de microscópio óptico.



Fonte: de própria autoria (2023).

A - Isolado LF. 200 crescendo em placa de Petri em meio BDA. **B** - Conídios do Isolado LF. 200 corados com Azul de Amann com aumento de 630x. **C** - Lâmina do Isolado LF. 200 com a presença de inúmeros conídios do isolado LF.200 com aumento de 100x. **D** - Câmara de Neubauer etapa para conídios pequenos com aumento de 400x.

Figura 5. Fotografias do isolado LF. 201 em microscópio óptico.



Fonte: de própria autoria (2023).

A - Isolado LF. 201 crescendo em placa de Petri em meio BDA. **B** - Câmara de Neubauer etapa para conídios pequenos com aumento de 100x; **C** - Conídios do Isolado LF. 201 corados com Azul de Amann com aumento de 400x.

4.3 Inoculação dos isolados nos discos foliares

Após o isolamento e identificação dos fungos, foi realizada a inoculação com cada um dos isolados nos genótipos de cajueiro, para avaliar a expressão da doença. Para a realização desta etapa, foi necessário preparar uma suspensão de esporos para cada isolado. Foi despejado 15mL de água com tween 80 estéril como agente dispersor (2,5%), em placa de Petri contendo o isolado cultivado a doze dias. O micélio do fungo foi escovado juntamente com a solução, em seguida despejado em funil para ser filtrado, por meio de gaze estéril. E com o auxílio da câmara de Neubauer foi feita a contagem de conídios, pelo método para conídios pequenos, nas etapas 1 e 2. A concentração final das soluções ficou em $2,1 \times 10^6$ esporos/mL para cada isolado.

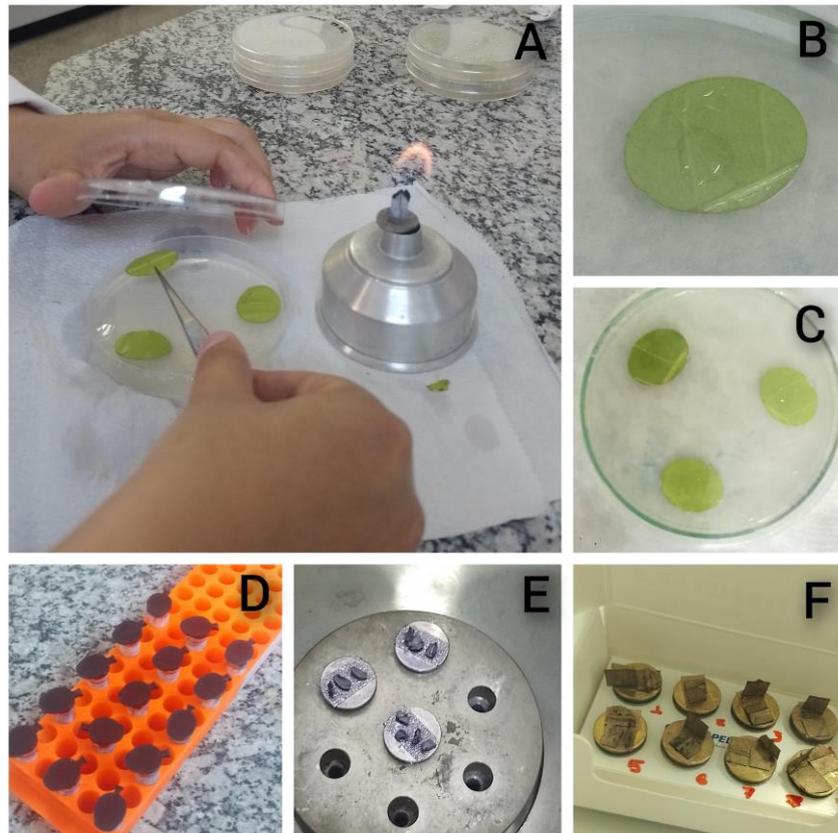
É importante ressaltar que as suspensões de esporos somente foram realizadas após atestação da presença de conídios dos fungos de *Colletotrichum* em microscópio ótico com aumento de 400x.

A inoculação das suspensões de esporos foi realizada em folhas intermediárias de cajueiro dos clones CCP 76, CCP 09 e CCP 226. As folhas foram cortadas com auxílio do cortador em formato de discos (de área conhecida: 254,34 mm²), dispostos de três em três, em placas de Petri com ágar, e colocadas em sala de incubação a temperatura de 27°C e 40% de umidade aproximadamente, sob luz artificial fluorescente continuamente durante o dia.

A inoculação nos discos de folha consistiu em dispor no centro da face abaxial de cada disco alíquotas de 30 µl de suspensão de esporos. As placas contendo a testemunha foram inoculadas com 30 µl de solução de água com o tween 80 estéril (concentração de 2,5%). Foram realizadas duas repetições para todos os genótipos.

Todos os discos de folhas, incluindo os discos testemunhas, foram submetidos a tratamento prévio, com a desinfestação dos discos foliares com hipoclorito de sódio (concentração de 1,5%) por um minuto. Em seguida, os discos foram lavados com água destilada estéril por mais um minuto, para a remover a solução anterior. E por fim, imersos em solução de ácido ascórbico estéril (concentração de 0,1%) por um minuto, a fim de prevenir a oxidação precoce das folhas.

Figura 6. Processamento das amostras.



Fonte: de própria autoria (2023).

A - Montagem do experimento. **B** - Disco de folha inoculado com água com tween 2,5%. **C** - Discos de folha dispostos em placa com ágar inoculadas com o isolado LF.200 em um tempo de 24 horas. **D** - Amostras do isolado LF.201 fixadas em Karnovsky dispostas em tubo Eppendorf escuro. **E** - Amostras do isolado LF.200 dispostas em metalizadora. **F** - Amostras prontas montadas em *stubs*.

4.4 Coleta das Amostras e Processamento para a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As amostras foram cortadas a partir do centro de cada disco foliar, de modo a se obter fragmentos em quadriláteros foliares de aproximadamente $0,5 \text{ cm}^2$. A frequência dos cortes variou de 0, 24, 48, 72, 120 e 144 horas. Dos três discos dispostos nas placas, dois foram fixados e um fotografado em estereomicroscópio, de modo a acompanhar o desenvolvimento da doença nos tecidos foliares. Os fragmentos foram colocados em tubos Eppendorf escuros e fixados com Karnovsky.

Para a análise de MEV, as amostras foram submetidas a um processamento. A pré-fixação ocorreu com imersão das amostras em solução Karnovsky diluída em tampão cacodilato de sódio 0,2M pH 7,2, por 48 horas e acondicionadas em geladeira. A seguir, as amostras pré-fixadas foram lavadas por três vezes com o tampão de cacodilato de sódio com intervalos de quinze minutos. Após as trocas com o tampão foi realizada a segunda fixação com tetróxido de ósmio (1%) por uma hora. Após este intervalo foi realizada a tríplice lavagem com água destilada em intervalos de quinze minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à série etanólica crescente, de 30, 40, 50, 70 e 100%, com intervalos de quinze minutos entre cada solução. A última concentração (100%), foi repetida por três vezes, de modo a remover totalmente a água e os fixadores das amostras.

Em seguida as amostras foram desidratadas em aparelho de ponto crítico, modelo EMS 850, utilizando CO₂ como fluido, para que a amostra mantivesse sua estrutura preservada. Após o ponto crítico, as amostras foram metalizadas com ouro. Posteriormente, coladas em fita de carbono dupla face sobre *stubs* metálicos. As superfícies abaxial, adaxial e transversal das folhas foram submetidas à visualização. As análises das amostras foram realizadas em um MEV TESCAN, modelo VEGA 3 SBU, com aceleração de 20 Kv para a visualização e obtenção das imagens.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testemunhas

Os discos foliares testemunhas se mantiveram íntegros até 144 HAI nos genótipos BRS 226 (Fig. 7-B; 8 -A, B e C) e o genótipo CCP 76 (Fig. 7-C; 9- A, B e C). O genótipo CCP 09, demonstrou um início de infecção a partir da extremidade da nervura foliar (Fig. 7-A e 10-A), que sugere a presença de patógenos endofíticos a partir de infecção quiescente nos tecidos internos da folha (VELOSO, 2022), uma vez que, os microrganismos da superfície foram removidos pelo prévio tratamento de desinfestação com hipoclorito de sódio (1,5%). Por outro lado, as testemunhas do genótipo CCP 09 apresentaram ausência de infecção na face adaxial da folha (Fig. 10-B) e entre as paredes vegetais da nervura foliar (Fig. 10-C) 144 horas após a inoculação (HAI).

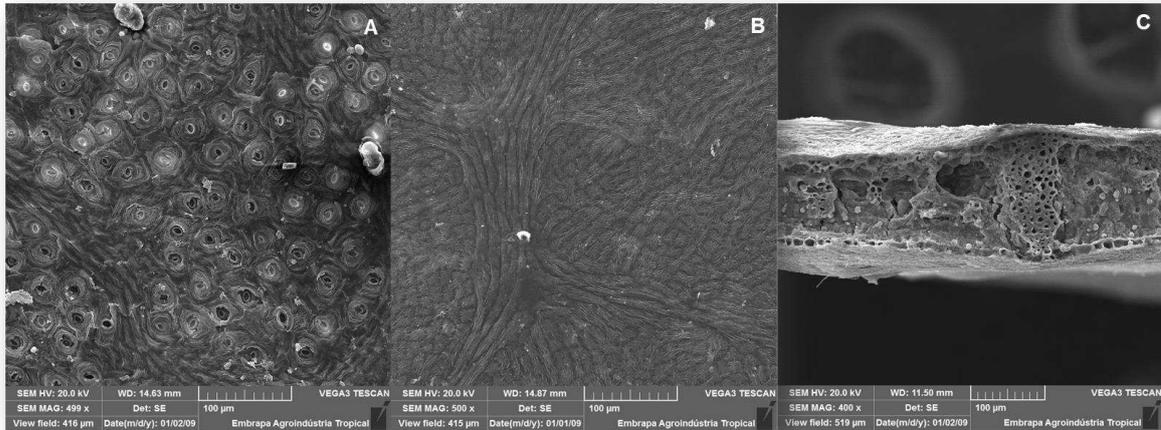
Figura 7. Discos Testemunhas 144 HAI.



Fonte: autoria própria (2023).

A - CCP 09; **B** - BRS 226; **C** - CCP 76

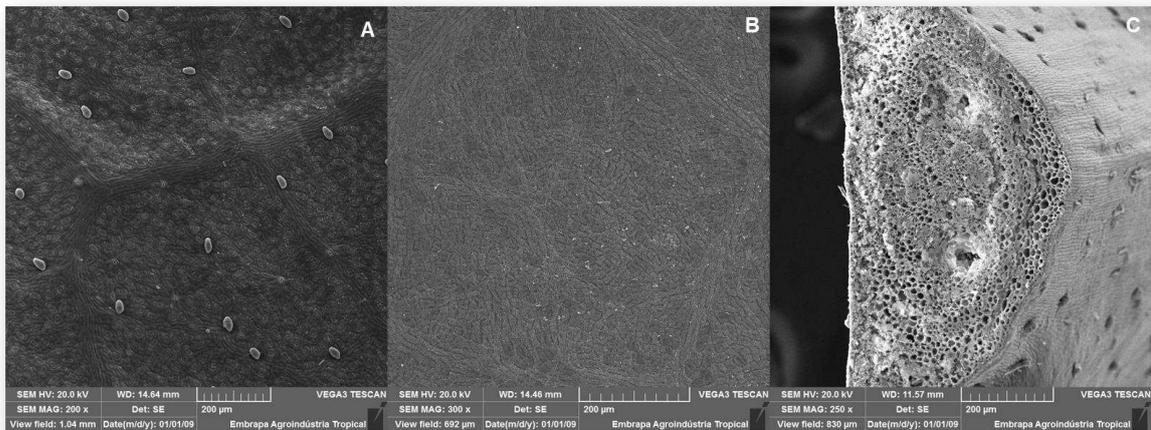
Figura 8. Eletromicrografias do genótipo BRS 226 144 HAI.



Fonte: autoria própria (2023).

A - Face abaxial; **B** - Face adaxial; **C** - Corte transversal.

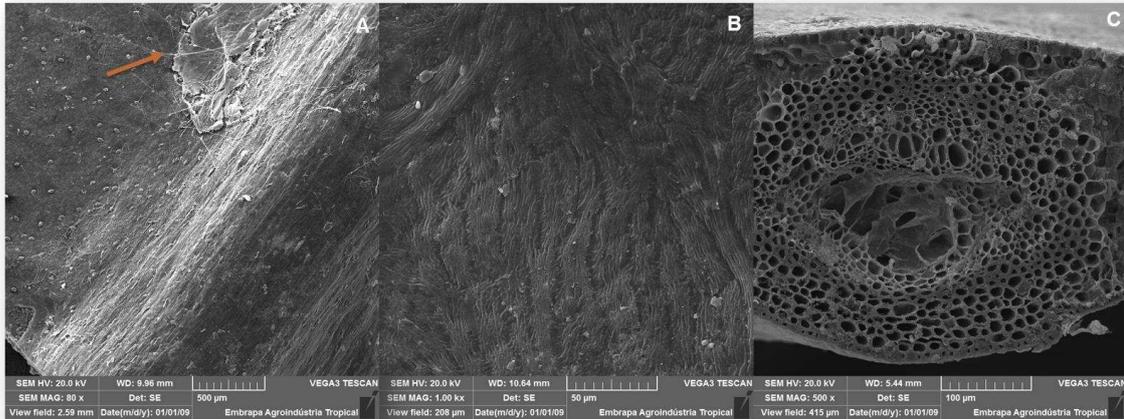
Figura 9. Eletromicrografias do genótipo CCP 76 144 HAI.



Fonte: autoria própria (2023).

A - Face abaxial; **B** - Face adaxial; **C** - Corte transversal.

Figura 10. Eletromicrografia do genótipo CCP 09 144 HAI



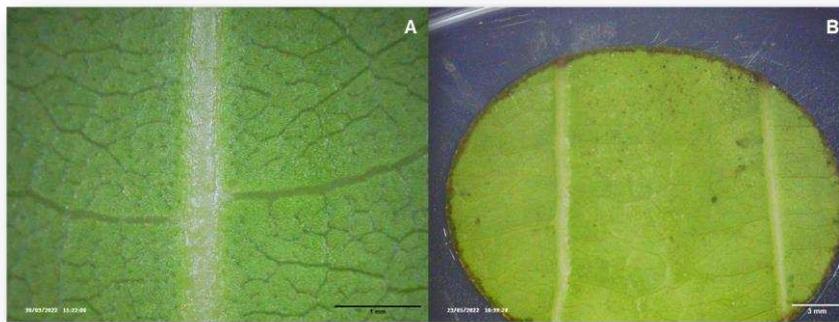
Fonte: autoria própria (2023).

A - Face abaxial; B - Face adaxial; C - Corte transversal.

5.2 Sintomas nos discos de folhas 24 HAI

Os discos foliares do genótipo CCP 76 não apresentaram lesões escurecidas nas primeiras 24 HAI (Fig. 11-A e B) para nenhum dos isolados.

Figura 11. Discos de genótipo CCP 76 24 HAI



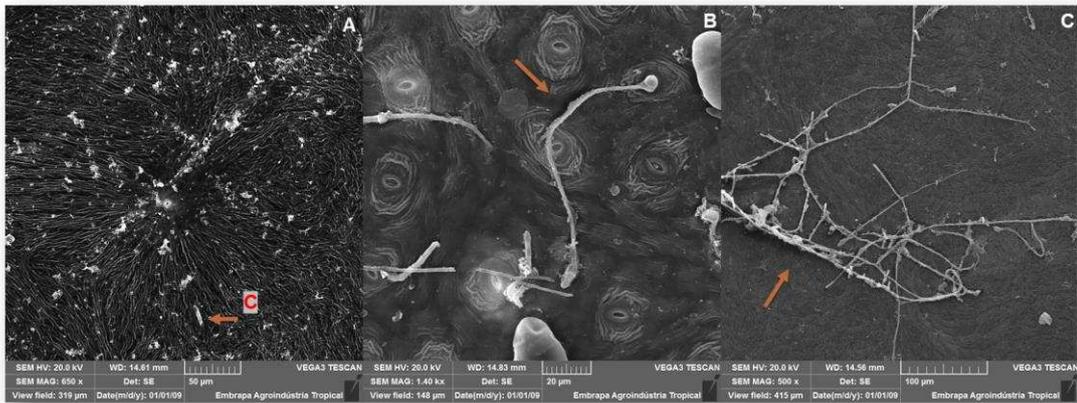
Fonte: autoria própria (2023).

A - Disco inoculado com o isolado LF. 200; B - Disco inoculado com o isolado LF. 201.

Entretanto, embora as fotografias feitas em lupa, não retratem sintomas na superfície dos discos foliares, as eletromicrografias demonstram um início de colonização pelo

patógeno já nas 24 HAI no genótipo CCP 76 pelo isolado LF 201 e nenhum sinal de colonização pelo isolado LF 200.

Figura 12. Eletromicrografias do genótipo CCP 76 24 HAI

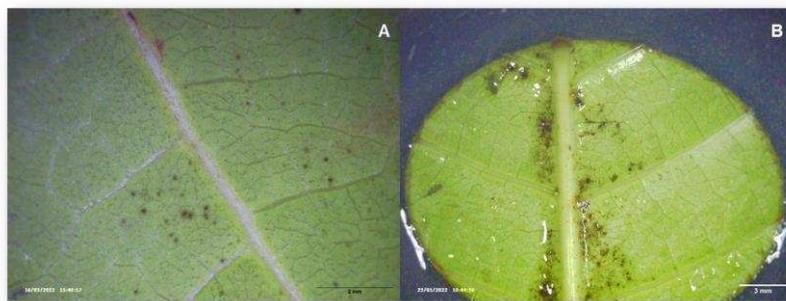


Fonte: autoria própria (2023).

A - Face adaxial do genótipo 24 HAI com o isolado LF 200; **C**:conídio não germinado; **B** - Face abaxial sendo colonizada por fungo LF. 201; **C** - Face adaxial sendo colonizada por fungo LF. 201.

O genótipo CCP 09, inoculado com o isolado LF 200 e LF 201 apresentou sintomas da doença, representados por lesões pontuais escurecidas já nas primeiras 24 HAI (Fig. 13).

Figura 13. Genótipo CCP 09 24 HAI



Fonte: autoria própria (2023).

A - Disco apresentando lesões pontuais inoculado com o isolado LF 200; **B** - Disco inoculado com LF 201 24 HAI.

Já o genótipo BRS 226 apresentou lesões pontuais 24 HAI (Fig. 14-A), 48 HAI (14-B) para o isolado LF. 200 e início de manchas necróticas 24 HAI (Fig. 14-C) para o isolado LF 201.

Figura 14. Genótipo BRS 226 24 HAI

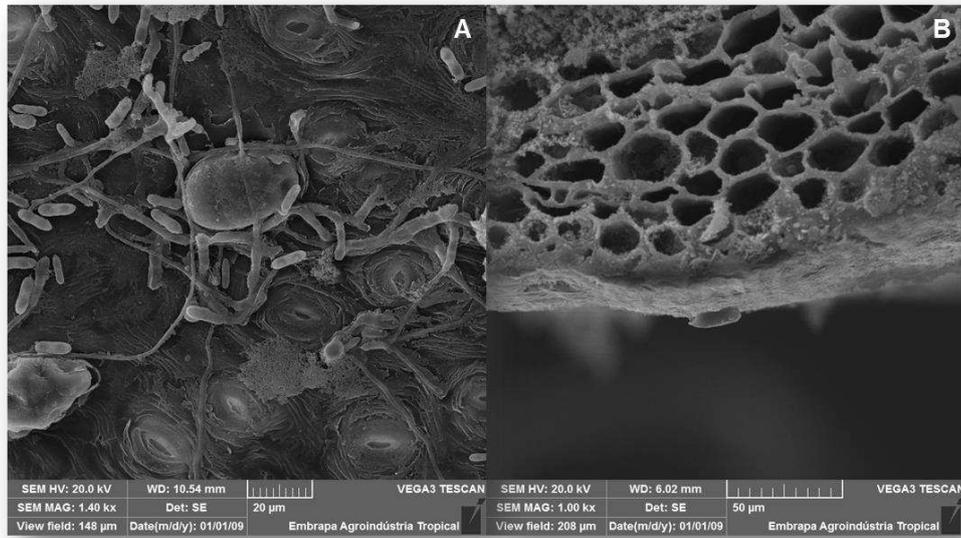


Fonte: autoria própria (2023)

A - Disco apresentando lesões pontuais inoculado com o isolado LF 200; **B** - Disco inoculado com LF 200 48 HAI; **C** - Manchas necróticas causadas pelo isolado LF 201.

Esses resultados foram relacionados com as eletromicrografias que confirmaram a infecção nos genótipos CCP 09 e BRS 226 (Fig. 15 e 16 respectivamente) pelo isolado LF. 200.

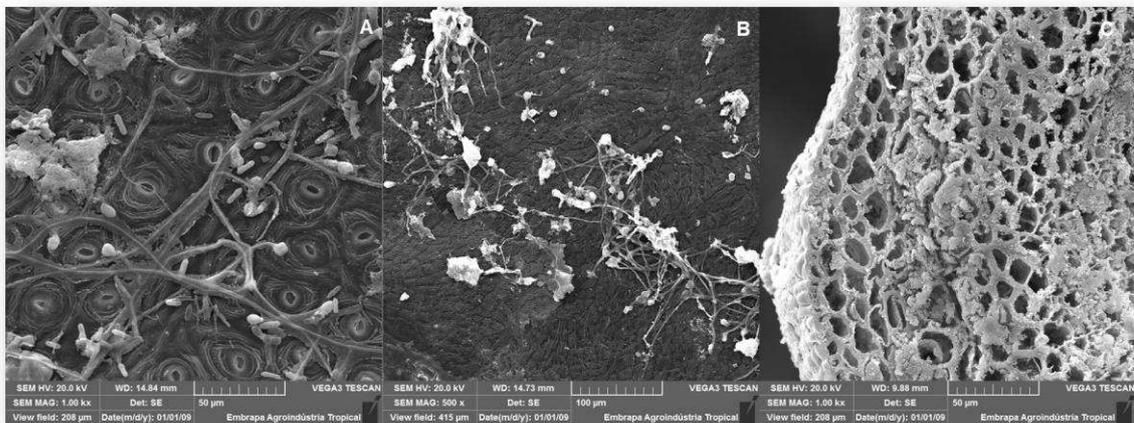
Figura 15. Eletromicrografia de genótipo CCP 09 24 HAI inoculado com o isolado LF 200



Fonte: autoria própria (2023).

A - Face abaxial; **B** - Corte transversal.

Figura 16. Eletromicrografia de genótipo BRS 226 24 HAI inoculado com o isolado LF 200



Fonte: autoria própria (2023).

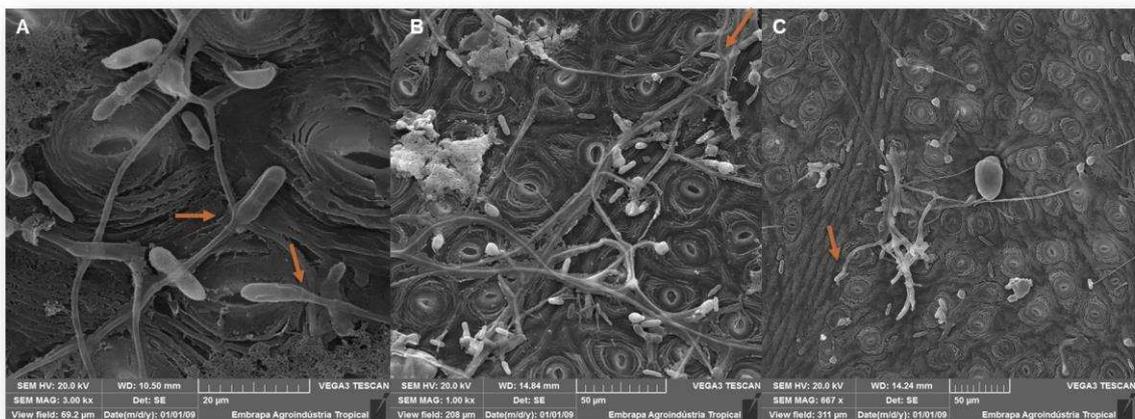
A - Face abaxial; **B** - Face adaxial; **C** - Corte transversal.

5.3 Estruturas de fixação

5.3.1 Tubos germinativos

Os tubos germinativos tiveram formação a partir das extremidades dos conídios para ambos os isolados, com a formação de um tubo germinativo por conídio. O isolado LF 200 teve sua germinação em até 24 HAI nos genótipos CCP 09 (Fig. 17-A) e genótipo BRS 226 (Fig. 17-B); já para o genótipo CCP 76, a germinação ocorreu por volta das 72 HAI (Fig. 17-C) com este isolado e 24 HAI com o isolado LF 201 (Fig. 18-A e B).

Figura 17. Tubos germinativos foram formados 24 e 72 HAI com o isolado LF 200, nos genótipos CCP 09, BRS 226 e CCP 76

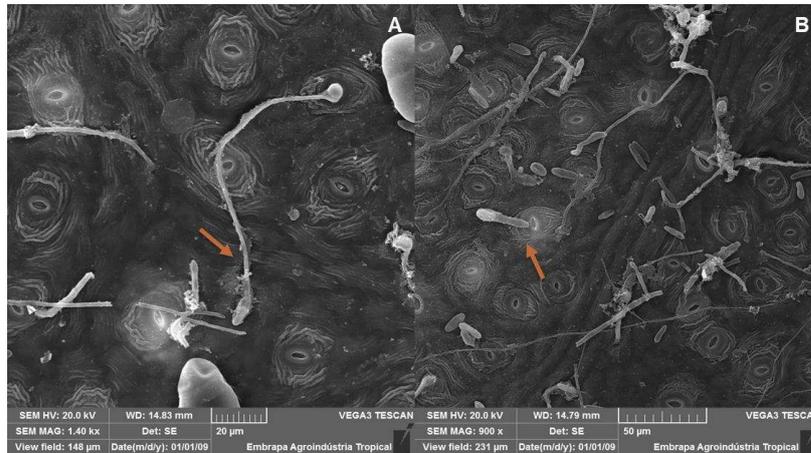


Fonte: autoria própria (2023).

A - Face abaxial do genótipo CCP 09 f, B - Face abaxial do genótipo BRS 226; C - Face abaxial de genótipo CCP 76 72 HAI.

A rápida emissão de tubos germinativos indica o reconhecimento da superfície hospedeira pelo *Colletotrichum*, provavelmente pela emissão de compostos voláteis que induzem a diferenciação celular (SILVA, *et al.* 2011).

Figura 18. Formação de tubos germinativos 24 HAI com o isolado LF 201 no genótipo CCP 76.



Fonte: autoria própria (2023).

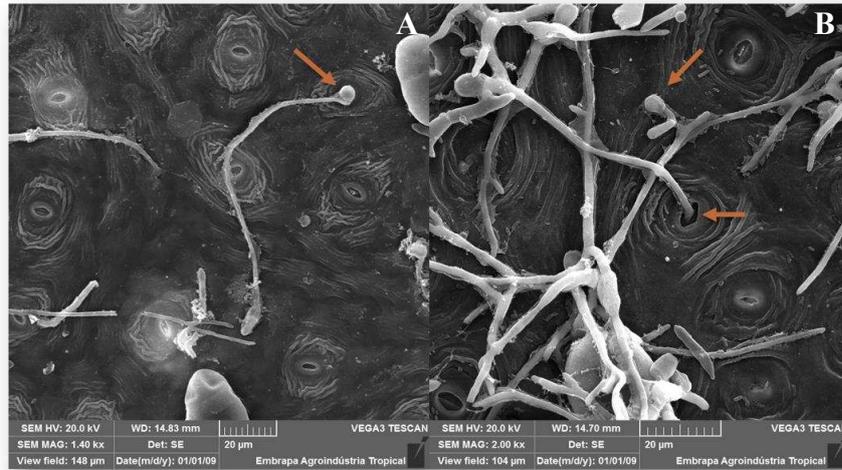
A - Face abaxial do genótipo CCP 76; **B** - Conídio germinando em face abaxial do genótipo CCP 76.

5.3.2 Apressórios

A formação de apressórios de formato globoso e achatado se deu para ambos os isolados em todos os genótipos com intervalos de tempo variáveis. As eletromicrografias demonstraram rápida colonização do isolado LF 201 no genótipo CCP 76, com a formação de estruturas de adesão (apressórios) a partir das primeiras 24 HAI (Fig. 19-A) e 72 HAI com o isolado LF 200 (Fig. 19-B).

Esse fato permitiu ao patógeno permanecer no mesmo local durante o tempo necessário para a colonização, utilizando-se inclusive dos estômatos para a penetração no mesófilo foliar e favorecendo a infecção pelas hifas (Fig. 19-B).

Figura 19. Apressórios de genótipo CCP 76 com o isolado LF 201 24 HAI e LF 200 72 HAI.

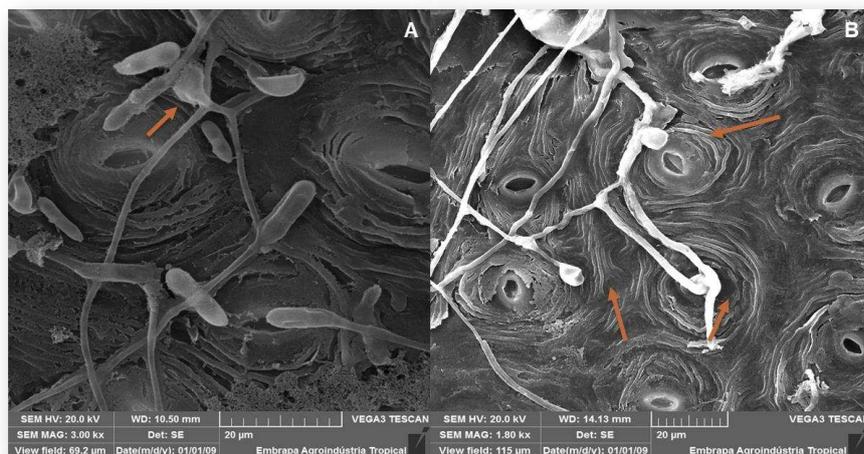


Fonte: autoria própria (2023).

A - Apressório globoso formado sobre estômato com o isolado LF 201; **B** - Apressório achatado inoculado com o isolado LF 200 s hifa penetrando os tecidos internos por meio de estômatos.

Para o isolado LF 200, notaram-se estruturas de fixação (apressórios) nos genótipos CCP 09 e BRS 226 a partir das primeiras 24 HAI (Fig. 20-A, 20-B).

Figura 20. Apressórios em genótipos CCP 09 e BRS 226 inoculados com o isolado LF 200.



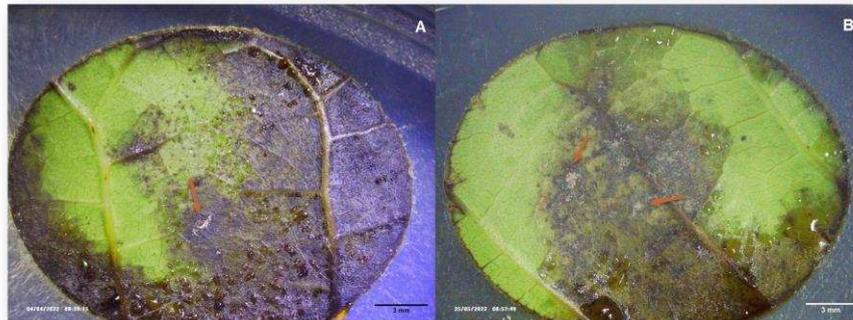
Fonte: autoria própria (2023).

A - Apressório formado em genótipo CCP 09 24 HAI; **B** - Apressórios achatados em genótipo BRS 226 posicionados sobre o disco foliar.

5.4 Estruturas reprodutivas

As estruturas reprodutivas do fungo foram coletadas em área do disco foliar indicada pela presença de massa de esporos alaranjada sobre a superfície do disco (Fig. 21-A e B). A partir das 144 HAI todos os discos de folhas inoculados com o isolado LF 200 dos genótipos CCP 09 (Fig. 24-A) e BRS 226 apresentaram necrose generalizada e as coletas foram encerradas.

Figura 21. Massa alaranjada sobre superfície foliar de genótipo BRS 226 indicando estruturas reprodutivas de *Colletotrichum*.

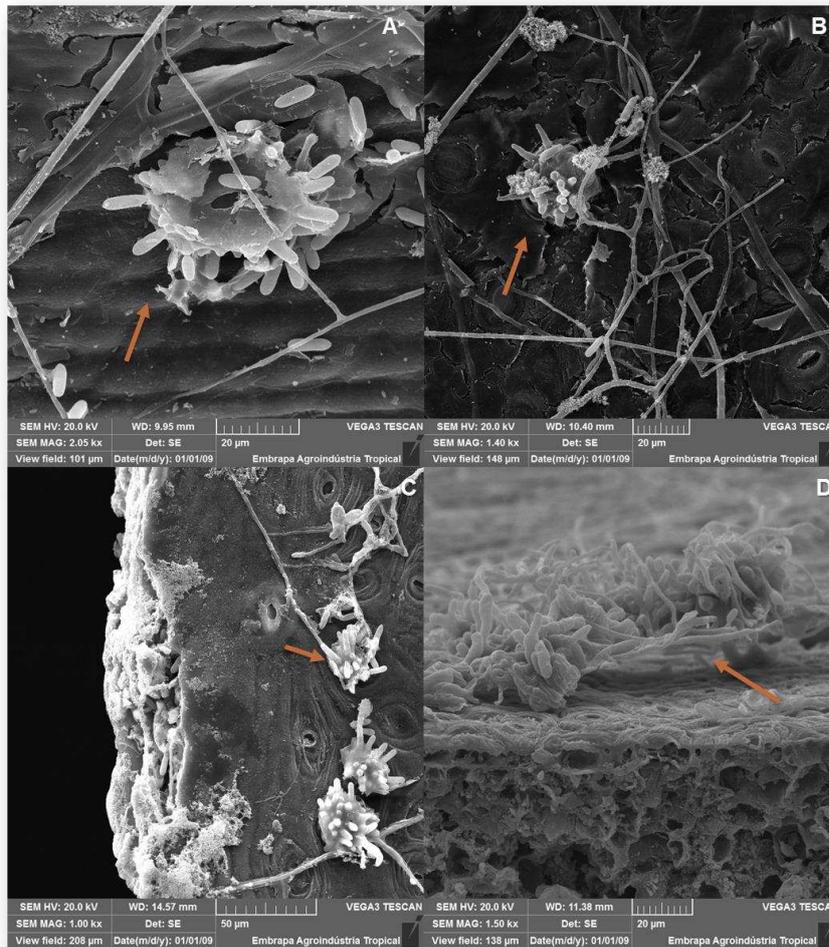


Fonte: autoria própria (2023).

A e B - Massa de esporos.

Foi observada a formação de estruturas reprodutivas nos genótipos CCP 09 (Fig. 22-A e B) e CCP 76 (Fig. 22-C), com o isolado LF. 200, bem como a ausência de conidióforos no genótipo BRS 226 para este isolado. Já para o isolado LF 201, não houve a ocorrência de estruturas de reprodução secundárias no genótipo CCP 76, tampouco para o genótipo CCP 09. Entretanto, foi observada a presença de acérvulo rompendo o tecido da superfície foliar (Fig. 22-D) de genótipo BRS 226 as 72 HAI isolado com LF 201 (LINS, ABREU e ALVES, 2007).

Figura 22. Estruturas reprodutivas.



Fonte: autoria própria (2023)

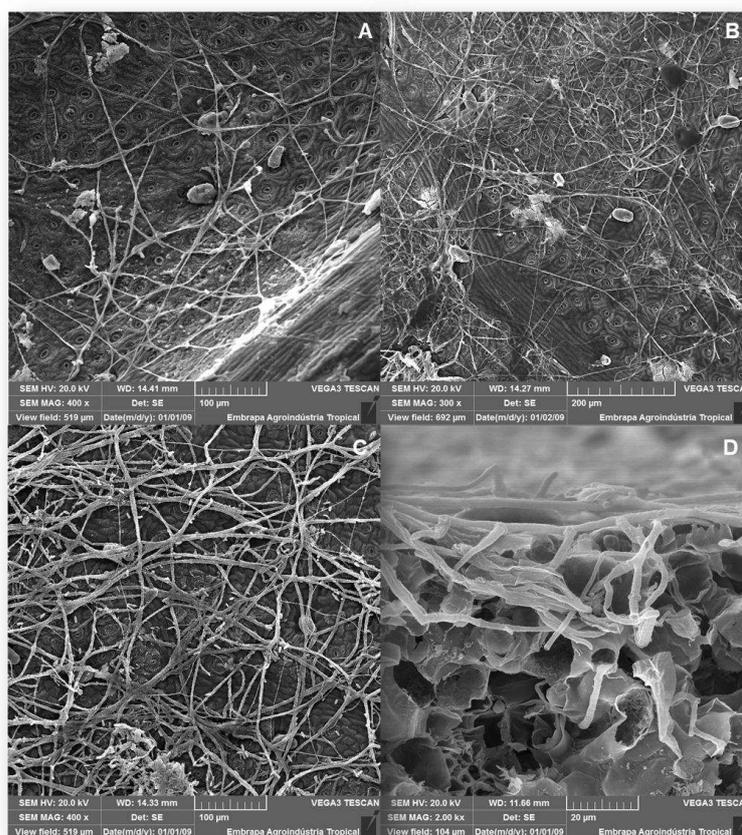
A e B- Genótipo CCP 09 inoculado com o isolado LF 200 120 HAI; **C** - Genótipo CCP 76 inoculado com o isolado LF 200 120 HAI; **D** - Acérvulo em genótipo BRS 226 com o isolado LF 201 72 HAI.

5.5 A agressividade da antracnose

O grau de agressividade da doença sobre o disco pertencente ao genótipo BRS 226 (Fig. 14-C), remete a relação parasitária estudada por Giblin *et al* (2010), que cita que o grau de agressividade dos patógenos pode variar conforme o hospedeiro de origem. E Serra *et al* (2008) sugere que isolados monospóricos de cajueiro podem ser mais agressivos que isolados multiespóricos (GIBLIN, *et al.* 2010; SERRA, *et al.* 2008; apud SILVA, *et al.* 2011). Considerando-se que, em estudos *in vivo*, este genótipo, este apresenta certa resistência à antracnose (LIMA, *et al.* 2019).

A infecção do genótipo BRS 226 se apresentou mais intensa com o isolado LF 201 (Fig. 23-C e D) que o isolado LF 200 (Fig. 23-A e B), visto que às 24 HAI, o genótipo BRS 226 já apresentava grandes manchas escurecidas na superfície da folha (Fig.14-C) enquanto que, para o isolado LF 200 apareceram lesões pontuais até as 48 HAI (Fig.14-B).

Figura 23. O comportamento do genótipo BRS 226 em relação aos isolados LF 200 e 201.



Fonte: autoria própria (2023)

A - BRS 226 inoculado com o isolado LF 200 24 HAI; **B** - BRS 226 inoculado com o isolado LF 200 144 HAI; **C** - BRS 226 inoculado com o isolado LF 201 120 HAI; **D** - Corte transversal de BRS 226 inoculado com o isolado LF 201 120 HAI.

O genótipo CCP 09, apresentou uma infecção muito maior nos tecidos internos da folha para o isolado LF 200 que para o disco inoculado com o isolado LF 201. As 120 HAI o genótipo CCP 09 inoculado com o isolado LF 200 apresentou fase necrotrófica (Fig.24-A e B), com relação parasitária intensa nos tecidos do parênquima paliçádico, com hifas atravessando

paredes vegetais de um lado a outro (Fig.25-A), com presença de unidades reprodutivas nas células dos tecidos (Fig.25-B) e presença de hifas intracelulares (Fig. 25-C).

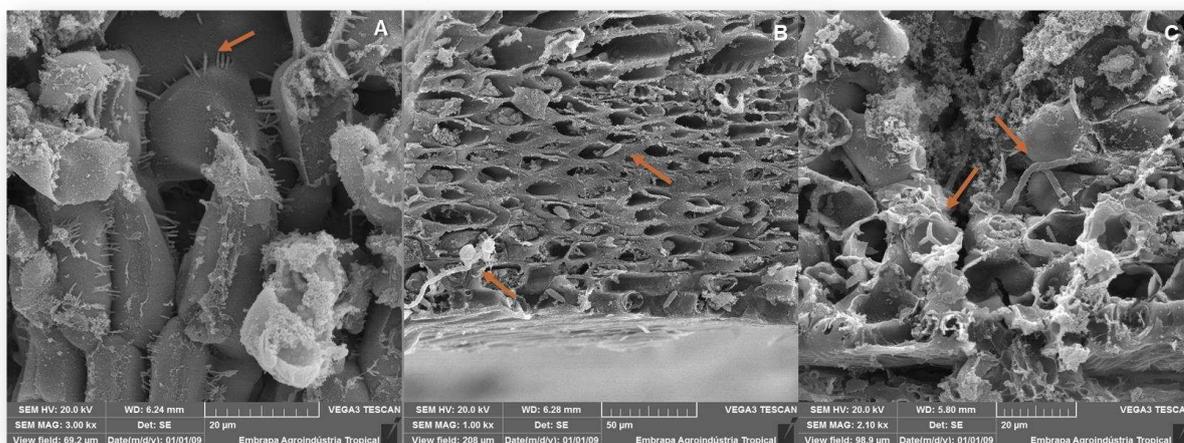
Figura 24. Discos de folha de genótipo CCP 09.



Fonte: autoria própria (2023).

A - Disco necrosado 144 HAI com o isolado LF 200; B - Disco parcialmente necrosado 72 HAI com o isolado LF 200. C - 72 HAI com o isolado LF. 201.

Figura 25. Tecidos internos do genótipo CCP 09 inoculado com o isolado LF 200.



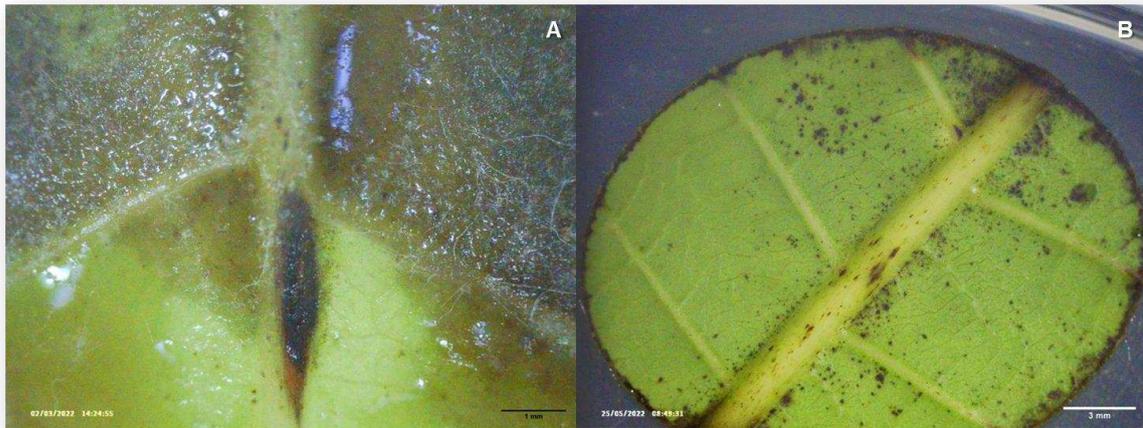
Fonte: autoria própria (2023).

A - Hifas atravessando células de um lado para o outro; B - Conídios dentro de células dos tecidos internos; C - Hifas destruindo células dos tecidos internos.

Observou-se no genótipo BRS 226, conhecidamente resistente à antracnose, uma infecção mais lenta com o isolado LF 200, do que a observada no genótipo CCP 09 (conhecidamente suscetível); o mesmo ocorreu no genótipo CCP 76 em comparação ao genótipo suscetível. Entretanto, ao comparar a infecção ocasionada pelos isolados LF 200 e 201

no genótipo CCP 76, observou-se que o isolado LF 200, foi mais agressivo em comparação ao LF 201, visto que, as 72 HAI com o isolado LF 200, o disco apresentou sintomas severos de manchas necróticas, hifas sobre o tecido e encharcamento (Fig. 26-A), enquanto que para o isolado LF 201 72 HAI, haviam apenas lesões pontuais no disco foliar (Fig.26-B).

Figura 26. CCP 76 72 HAI.



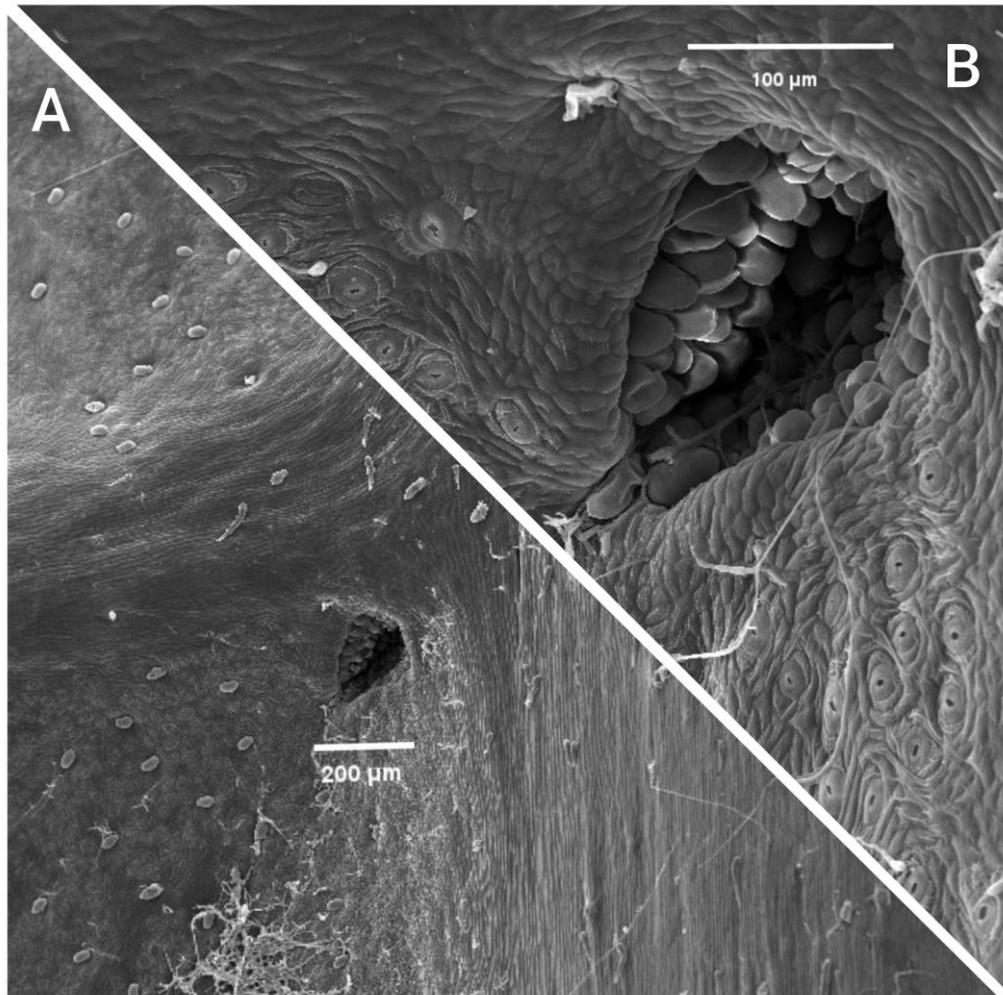
Fonte: autoria própria (2023).

A - 72 HAI com o isolado LF 200; **B** - 72 HAI com o isolado LF 201.

No último dia de coleta do experimento, os discos foliares dos genótipos BRS 226 e CCP 76 ainda não se apresentavam completamente necrosados.

Foi observada a presença de estrutura semelhante a um aglomerado de glândulas (Fig. 27 - A e B) situadas no encontro entre a nervura principal e secundária da folha, nos genótipos BRS 226 (Fig. 27-A e B) e CCP 09 (Fig. 28-A). Atualmente essas glândulas são encontradas em folhas de cajueiro, sugerindo uma possível estrutura de defesa da planta contra o agente patogênico.

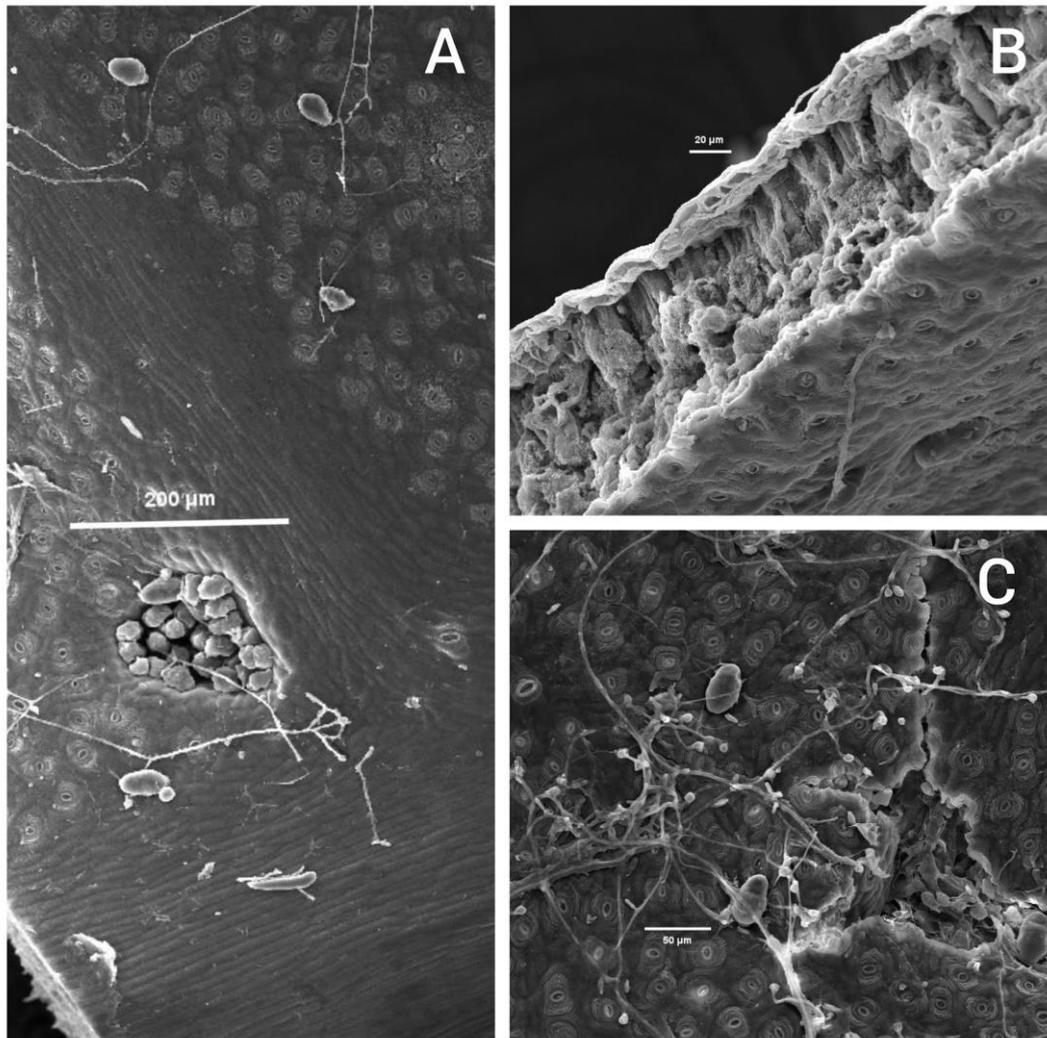
Figura 27. Aglomerado de glândulas em genótipo BRS 226.



Fonte: autoria própria (2023).

A - Aglomerado de estruturas esféricas em depressão no encontro entre a nervura principal e secundária do limbo foliar. **B** - Hifas de fungo colonizando estruturas esféricas.

Figura 28. Genótipo CCP 09 inoculado com o isolado LF 201.



Fonte: autoria própria (2023).

A - Aglomerado de estruturas esféricas em limbo foliar. **B** - Corte transversal de folha sendo degradada pela infecção fúngica 120 HAI. **C** - Hifas colonizando superfície foliar 72 HAI.

Os isolados foram capazes de infectar os tecidos internos de todos os clones, por aberturas naturais ou não e sem a presença de ferimentos. Até mesmo infectar genótipos resistentes à antracnose. Assim como no trabalho de Lins, Abreu e Alves de 2007, que apresentou estudos histopatológicos de *Colletotrichum* em plântulas de cafeeiro, e foi observada a formação de tubo germinativo nas primeiras 24 HAI, embora os espécimes LF 200 e LF 201 não tenham apresentado germinações laterais, apenas nas extremidades. Também foi observada a formação de apressórios globosos de contornos regulares. Sobre as estruturas de frutificação, no trabalho de Lins, Abreu e Alves, o *C. dematium* formou acérvulos sobre a cutícula foliar, já para os isolados LF 200 e LF 201, estas estruturas apresentaram-se emergindo a partir dos

tecidos internos, após infecção extensa, colapsando a cutícula foliar como sugere Veloso *et al* em seu trabalho sobre antracnose do cajueiro.

O aparecimento das estruturas de fixação (tubos germinativos, hifas e apressórios) e estruturas de reprodução, se mostraram distintas segundo o genótipo e o isolado utilizado variando conforme o tempo.

A ausência de sintomas apresentada no genótipo CCP 76 24 HAI com o isolado LF 201, demonstra como ocorre a fase biotrófica do patógeno no hospedeiro. O fungo invade os tecidos internos do hospedeiro, e expande-se para áreas adjacentes, sem causar necrose imediata nos tecidos. Ao final do experimento para este genótipo, observou-se que o mesmo apresentava apenas lesões pontuais nos discos inoculados com o isolado LF 201, demonstrando sua resistência à doença.

Vale ressaltar que as condições em que o experimento se encontrava eram favoráveis ao desenvolvimento da doença, uma vez que a temperatura se encontrava em torno de 27°C e umidade 45%.

6 CONCLUSÕES

Conclui-se que a caracterização do processo de infecção para todos os isolados inoculados em todos os clones utilizados foi exitosa. O que permitiu documentar através das fotos e eletromicrografias as estruturas de deposição, colonização, fixação, reprodutivas e parasitárias nos discos foliares variando conforme o tempo e o genótipo. Observou-se que o patógeno infecta os tecidos internos dos discos de folhas de modo direto e indireto.

Constatou-se ainda diferenças no comportamento dos genótipos utilizados, onde o genótipo BRS 226 citado como resistente na literatura, apresentou susceptibilidade para o isolado LF 201. O genótipo CCP 76 mostrou-se mais resistente aos isolados que os demais genótipos, embora tenha sido infectado pelo patógeno, porém, com sintomas menos expressivos. E, por fim, confirmou-se a susceptibilidade do isolado CCP 09 a ambos os isolados.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para se observar o início da germinação dos conídios, seria necessário a visualização em intervalos inferiores a 24 horas.

Para melhor entendimento é necessário realizar a extração de DNA e sequenciamento para identificar o patógeno a nível de espécie.

Este estudo, portanto, se apresenta pioneiro para a demonstração do processo infeccioso do *Colletotrichum* em cajueiro com diferentes isolados, testado em genótipos de resistências variadas, relacionando sintomas visíveis em estereomicroscópio, por meio da fotografia, com a observação detalhada a nível microscópico com MEV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, Levi de M.; PAIVA, João R.; CAVALCANTI, José J. V. **Recursos Genéticos do Cajueiro: Situação Atual e Estratégias para o Futuro**. In: QUEIROZ, M. A. de; GOEDERT, C. O.; RAMOS, S. R. R. (ed.). **Recursos genéticos e melhoramento de plantas para o Nordeste brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido; Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1999. P. 568-589.

BENTES, Jânia L. S. da.; BARRETO, Robert W. **Reavaliação Taxonômica de *Colletotrichum guaranicola* Albuquerque. Agente Causal da Antracnose do Guaranazeiro**. Notas e Comunicações. Acta Amazônica, 34-1, Manaus, 2004. Disponível em: <https://acta.inpa.gov.br/fasciculos/34-1/BODY/v34n1a17.html> Último acesso: 12/06/2023.

BRAINER, Maria S. de C. P. **Cajucultura**. Caderno Setorial ETENE, Ano 7, nº 230, Junho, 2022, p. 1-18. Disponível em: <https://www.bnb.gov.br/etene/caderno-setorial>. Último acesso: 25 de Junho de 2023.

CARBONI, Roberta C. D. **Complexo de Espécies de *Colletotrichum* Associados aos Citros e a Outras Frutíferas no Brasil**. 2018. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Jaboticabal, 2018.

CARVALHO, Beatriz M. **Infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em Folhas de Maracujazeiro-Amarelo (*Passiflora edulis* Sims)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, 2016.

CAVALCANTI, José J. V.; et. al. **Resistência Genética de Clones de Cajueiro Anão Precoce às Principais Fitomoléstias**. Boletim de pesquisa, 35. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. EMBRAPA Agroindústria Tropical. Fortaleza, Outubro de 2000.

CORDEIRO, Andrey B.; et. al. **Caracterização Morfológica e Cultural de Isolados de *Colletotrichum* spp. Obtidos de Cafeeiros no Estado do Paraná**. In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil, 6. 2009, Vitória, Anais ... Vitória: Consórcio de Pesquisa Café, 2009. Disponível em: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/consorcio/separador2/simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/547-anais-do-vi-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil#12>. Acesso: 12/06/2023.

COSTA, Jaqueline F. O. de. **Caracterização e Epidemiologia Comparativa de Espécies de *Colletotrichum* em Anonáceas no Estado de Alagoas**. Tese (Doutorado Agronomia). Universidade Federal do Alagoas, Rio Largo, 2014.

CURVELO, Carmen R. S.; et. al. **Microscopia Eletrônica de Varredura do Processo Infecioso de *Ramularia areola* em Folhas de Algodoeiro**. (Parte da Dissertação de Mestrado

da primeira autora - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG), *Tropical Plant Pathology*, vol. 35, 2, p. 118-113, March-April, 2010.

FREITAS, Marcelo L. O. **Etiologia, Inoculação e Escala Diagramática no Patossistema (*Colletotrichum* spp.) x Cafeeiro**. 2014. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2014.

LIMA, Joilson S.; *et. al.* **Reação de Clones de Cajueiro-anão à Antracnose e ao Mofo-Preto**. Comunicado Técnico, 247. EMBRAPA Agroindústria Tropical, Fortaleza, Março, 2019.

LIMA, Joilson S.; MOREIRA, Renato C.; CARDOSO, José E., SILVA, Luís G. C. **Resistência de Clones de Cajueiro-Comum à Antracnose**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 73, EMBRAPA Agroindústria Tropical, 1ª edição, Fortaleza, 2013.

LINS, Severina R. O.; ABREU, Mário S.; ALVES, Eduardo. **Estudos Histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em Plântulas de Cafeeiro**. Fitopatol. Bras. 32(6), p. 488-495, nov - dez 2007.

LIU F. *et. al.* **Updating Species Diversity of *Colletotrichum*, with a Phylogenomic Overview**. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. Studies in Mycology 101: 1–56, Beijing, 2022.

KRUGNER, Tasso L.; BACCHI, Lilian M.A. **Fungos**. In: AMORIM, L.; KIMATI, H.; BERGAMIN FILHO, A.B. **Manual de Fitopatologia**. São Paulo: Agronômica Ceres LTDA, 1995, pág. 46-95.

MARTINS, Marlon V. V.; CARDOSO, José E.; VIANA, Francisco M. P. **Doenças do Cajueiro**. In: **Sistema de Produção Embrapa**, vol. 1. Versão eletrônica. ROSSETTI, *et. al.* P. 97-124, Julho, 2016 .

MARTINS, Marlon V. V.; SERRANO, Luiz A. L.; ARAÚJO, Francisca S. A; FREIRE, Francisco das C. O. **Saiba como Diferenciar os Sintomas do Oídio e da Antracnose em Cajueiro**. Folders. Publicação *online*. Fortaleza, 2020. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1124366/1/FCC-002-oidio-antracnose.pdf>. Último acesso: 29 de Junho de 2023.

MELLO, Sueli C. M.; REIS, Ailton.; SILVA, João B. T. da. **Manual de Curadores de Germoplasma - Micro-organismos: Fungos Filamentosos**. Documentos (online). EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, pág. 25, Julho, 201. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/149773/1/doc335-134.pdf>. Acesso: 25/01/2023.

MENEZES, M. **Aspectos Biológicos e Taxonômicos de Espécies do Gênero *Colletotrichum***. Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, vol. 3, PE, 2006, p.170-179.

MICHEREFF, Sami J. **Fundamentos da Fitopatologia**. Recife, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, 2001, p. 172.

MORAES, Aurea M. L. de.; PAES, Rodrigo A. de; HOLANDA, Verônica L. **Micologia**. *In: Conceitos e Métodos para Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde*, volume 4. MOLINARO, Etelcia M. de.; CAPUTO, Luzia F. G.; AMENDOEIRA, Maria R. R. Rio de Janeiro, EPSJV, IOC, 2009. p. 400-494.

MOREIRA, Renato C.; CARDOSO, José E.; LIMA, Joilson S. **Resistência de Clones de Cajueiro Comum à Antracnose**. *In: CONGRESSO BRASILEIRO DE FRUTICULTURA*, 21., 2010, Natal. Anais... Natal: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2010.

OLIVEIRA, Vilalba P.; MENEZES, Maria; LIMA J. Albresio A. **Fase Ascógena e Patogenicidade do Agente da Antracnose do Cajueiro (*Anacardium occidentale* L.)**. Cad. Ômega Universidade Federal Rural de Pernambuco. Sér. Agron., Recife, 1(1), p. 89-95, 1985.

PINTO, Olienaide R. O. **Reação de Clones Comerciais de Cajueiro ao Oídio**. Tese (Doutorado em agronomia). Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2016.

SILVA, Daiana da. *et. al.* **Histopatologia da Infecção de *Colletotrichum gloeosporioides* em Folhas e Frutos Destacados de Cafeeiro**. *In: Simpósio de Pesquisa dos Cafés do Brasil*, 7. Anais, Araxá...Consórcio Pesquisa Café, Araxá, 2011. Disponível em: <http://www.consorciopesquisacafe.com.br/index.php/consorcio/separador2/simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil/548-anais-do-vii-simposio-de-pesquisa-dos-cafes-do-brasil#11> Último acesso: 15 de Junho de 2023.

SILVA, Luís G. C. da. **Caracterização de Isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* Associados à Antracnose do Cajueiro**. Tese (Doutorado em agronomia). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

SOARES, Maria O. **Phylogenetic Characterization, Infectious Process and Alternative Control of *Colletotrichum* in Avocado**. Tese (Doutorado em Agronomia). Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2019

TANAKA, Francisco A. O. **Microscopia Eletrônica e Microscopia de Luz**. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, Março, 2016.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12 Porto Alegre: Artmed, 2017, 935 p.

VELOSO, Josiene S. **Filogenia e Epidemiologia de Espécies de *Colletotrichum* associadas à Antracnose do Cajueiro**. 2017. Tese (Doutorado em Agronomia) Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2017.

VELOSO, Josiene S.; *et. al.* **Antracnose do Cajueiro: Etiologia, Sintomatologia e Aspectos Epidemiológicos**. Revisão Anual de Patologia de Plantas. Recife, vol 28, p. 200-214, 2022.