

# HISTOPATOLOGIA CAULINAR DE DUAS ESPÉCIES DE *Stylosanthes* INFECTADAS POR *Colletotrichum gloeosporioides*\*

## STEM HISTOPATHOLOGY OF TWO *Stylosanthes* SPECIES INFECTED BY *Colletotrichum gloeosporioides*

Vanessa de Fátima Jerba<sup>1,2</sup>, Carlos Eduardo Marchi<sup>1,2</sup>,  
Celso Dornelas Fernandes<sup>1,3</sup>, Arnildo Pott<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Autor para contato: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil; (67) 386-2075; e-mail: vjerba@yahoo.com.br

<sup>2</sup> Bolsista DCR/CNPq/FUNDECT-MS

<sup>3</sup> Universidade para o Desenvolvimento do Estado e da Região do Pantanal - UNIDERP, Campo Grande, MS

Recebido para publicação em 11/04/2006

Aceito para publicação em 29/05/2006

### RESUMO

O gênero *Stylosanthes* é um dos mais promissores dentre as leguminosas forrageiras tropicais, sendo seu cultivo limitado pela antracnose. Essa doença, causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides*, ocorre em todas regiões produtoras e tem como principal forma de controle a utilização de genótipos resistentes. Objetivou-se caracterizar a histopatologia caulinar de duas espécies de *Stylosanthes* infectadas naturalmente por *C. gloeosporioides*. Amostraram-se lesões caulinares de *S. capitata* e *S. guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão, de material vegetativo coletado nos campos experimentais da Embrapa Gado de Corte. As amostras foram fixadas em FAA 50 (Formaldeído, Ácido Acético e Álcool 50%), conservadas em álcool a 70% e infiltradas em historresina. Realizaram-se secções transversais, com 8-10 µm de espessura, as quais foram coradas em azul de Toluidina a 0,05%. A análise dos tecidos gerou evidências de que a antracnose afeta diferentemente as duas espécies de *Stylosanthes*. Adicionalmente, constatou-se que os tecidos condutores, xilema e floema, assim como a medula próxima ao xilema, sofreram hipertrofia celular, caracterizadas por citoplasma denso e núcleo volumoso. Observou-se a formação de tilose nos elementos de vaso e degradação de células parenquimáticas. *S. guianensis*, ao contrário do *S. capitata*, apresentou lesões superficiais e pequenas, composta por células infectadas inconspícuas e poucas alterações celulares. Entretanto, estas pequenas alterações foram observadas em todos os tecidos caulinares, concentrando-se nas regiões do parênquima cortical, epidérmica e medular. Os resultados indicam que houve diferença histológica nas espécies estudadas. *S.*

\* Trabalho financiado pela Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado do Mato Grosso do Sul, FUNDECT

*guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão apresentou reação de resistência à antracnose, o que não foi observado no acesso de *S. capitata*.

Palavras-chave: Antracnose, estilosantes, histopatologia, infecção, leguminosa forrageira, resistência

## ABSTRACT

*Stylosanthes* is the most promissory genus of forage legumes, but its crop is limited by the occurrence of anthracnose. This disease is caused by the fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and occurs in all production regions. The main form of control is the use of a resistant genotype. The aim of this work was to describe the stem histopathology of two *Stylosanthes* species naturally infected by *C. gloeosporioides*. Stem lesion samples of *S. capitata* and *S. guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão were collected in experimental fields at Embrapa Beef Cattle. Samples were fixed in FAA 50 (Formaldehyde, Acetic Acid and 50% Alcohol), conserved in 70% alcohol and infiltrated in historesin. Cross sections with a thickness of 8-10  $\mu\text{m}$  were performed and dyed with 0.05% Toluidine Blue. *S. capitata* presented large extensions of injured stem tissue. The conducting tissues, xylem and phloem, as well as the pith close to the xylem presented cell hypertrophy, with a dense cytoplasm and an enlarged nucleus. *S. guianensis* showed superficial and small lesions on infected cells and little cellular changes in all stem tissues, mainly in the cortical parenchyma of the epidermis and pith. The results indicate differences in histopathology in the two species studied; while *S. guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão showed resistance to anthracnose, such a resistance was not observed in *S. capitata*.

Key words: anthracnose, histopathology, infection, forage legume, resistance

## 1. Introdução

O gênero *Stylosanthes* inclui grande quantidade de espécies com potencial forrageiro. Neste gênero encontram-se as principais e mais importantes cultivares de leguminosas forrageiras tropicais desenvolvidas no Brasil, assim como em outros países tropicais. De modo geral, *Stylosanthes* spp. se adapta bem a solos de baixa fertilidade, assim como resistem ao pastejo pesado de animais e ao estresse hídrico (Gardener, 1984). Por isso, o seu uso como forrageira no nordeste da Austrália tem aumentado desde 1960 (Hetherington *et al.*, 1995). O uso do *Stylosanthes* spp., quando em consórcio com espécie de gramíneas forrageiras tem melhorado o rendimento das pastagens

por meio da incorporação de nitrogênio no sistema, devido ao bom teor protéico, otimizando o ganho de peso de animais pelo seu consumo direto (Verzignassi e Fernandes, 2002). *Stylosanthes* spp. têm sido também utilizado para a recuperação de solo e consorciação com diversas culturas como, por exemplo, a seringueira (Thomas *et al.*, 1987).

Entretanto, na Austrália, América do Sul, África e Tailândia a produção de estilosantes é severamente limitada pela ocorrência da antracnose (Irwin *et al.*, 1984). Tal doença, causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, causa manchas pardas com aréolas marrons em folhas e caules, assim como desfolha. Segundo Chakraborty (2004), a antracnose, em função da sintomatologia e gama de hospedeiros, pode ser

classificada em biotipos A e B. Ainda, de acordo com aquele autor, o biotipo A produz lesões discretas com centro cinza e margens marron-escuras sobre toda a parte aérea e infecta todas as espécies, enquanto o biotipo B infecta principalmente *S. guianensis* e causa necroses terminais nos folíolos, com destruição das partes da planta afetada, e lesões não delineadas claramente sobre as folhas. Esta classificação é utilizada para as cultivares australianas, visto que na Austrália foram detectados os dois tipos de antracnose. Porém, na América Latina a diferença entre os dois biotipos não é acentuada, sugerindo que nesta região existem mais tipos de antracnose (Chakraborty, 2004).

No Brasil, a antracnose também limita a produção dessas leguminosas, e a maneira mais eficaz de controlá-la é por meio do uso de cultivares resistentes (Verzignassi e Fernandes, 2002). Para garantir a disponibilidade de genótipos resistentes, com boa durabilidade, são necessários estudos multidisciplinares, incluindo sobretudo os epidemiológicos, bioquímicos e histopatológicos. Esses últimos contribuem para caracterizar os mecanismos de resistência presentes no hospedeiro, bem como o comportamento do patógeno nos tecidos da planta. Trabalhos relacionados à histopatologia de órgãos com antracnose foram realizados para cultivares australianas de estiloides, os quais elucidaram muitas questões acerca da resistência de tais cultivares (Irwin *et al.*, 1984; Vinijsanum *et al.*, 1987; Ogle *et al.*, 1990). Diante da importância desses estudos, objetivou-se caracterizar a histopatologia caulinar de duas espécies de *Stylosanthes* infectadas naturalmente por *C. gloeosporioides*.

## 2. Material e métodos

Amostras de lesões caulinares de um acesso de *Stylosanthes capitata* e *S. guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão, foram obtidas nos campos experimentais da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS. As lesões caulinares foram todas provenientes de infecção natural.

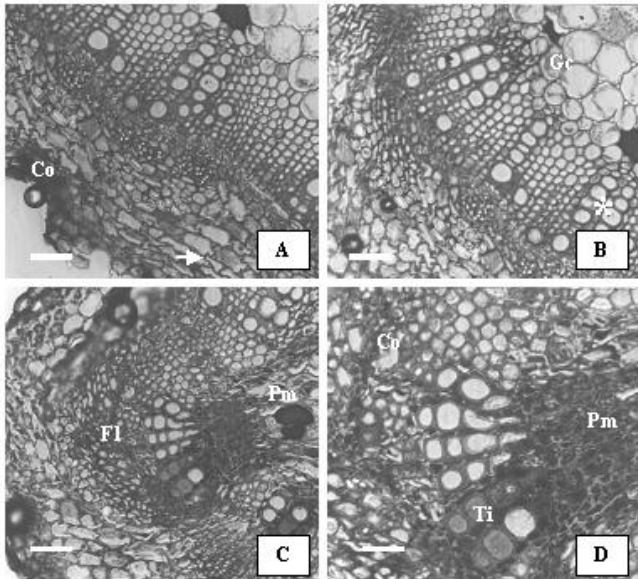
Ambas as amostras foram fixadas em FAA 50 (Formaldeído:Ácido Acético: Álcool 50%) por 48 ho-

ras e conservadas em etanol a 70% (Johansen, 1940). Os fragmentos foram desidratados em série etanólica ascendente e infiltrados em resina glicol-metacrilato (Gerrits, 1991). As amostras infiltradas foram seccionadas transversalmente, em micrótomo rotatório, com 8-10  $\mu$ m de espessura e coradas em azul de Toluidina a 0,05% pH 4,7 (O'Brien *et al.*, 1964). As secções foram analisadas em microscópio de luz e fotodocumentadas.

## 3. Resultados e discussão

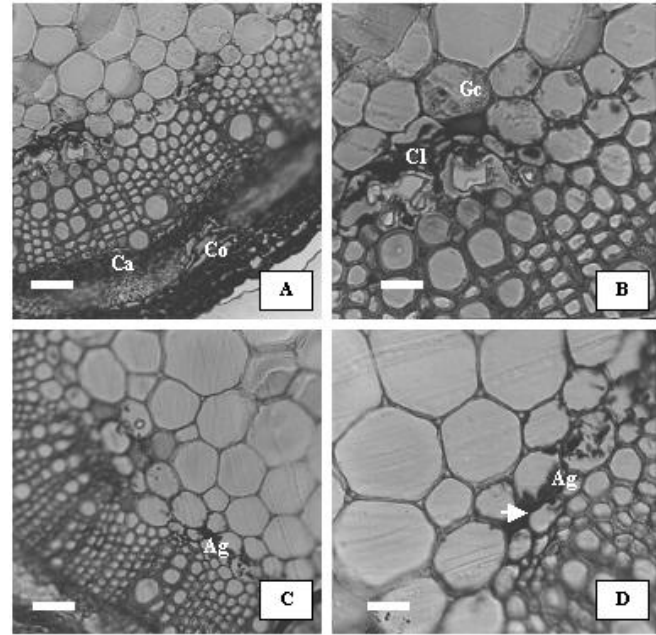
Diferentes alterações tissulares foram observadas nas espécies de *Stylosanthes* analisadas, sendo os tecidos do *S. capitata* (Figura 1) mais afetados em relação aos do *S. guianensis* (Figura 2).

O *S. capitata* apresentou grandes extensões de áreas lesionadas, ocorrendo alterações em todos os tecidos caulinares (Figura 1A). Os tecidos condutores, xilema e floema, assim como a medula próxima ao xilema, sofreram hipertrofia celular (Figura 1B), caracterizadas por citoplasma denso e núcleo volumoso. Ainda no xilema, foi possível observar tilose nos elementos de vaso (Figura 1C) e degradação de células parenquimáticas (Figura 1D). A presença e a velocidade de formação da tilose têm relação com os mecanismos de resistência a patógenos vasculares (Pascholati e Leite, 1995). As células do parênquima cortical apresentaram crescimento intrusivo (Figura 1A), indicando desarranjo na parede celular. A alta incidência de infecção no parênquima cortical corrobora com a hipótese de que células parenquimáticas são mais suscetíveis que as demais (Irwin e Cameron, 1978). Amorim (1995) relatou que o aumento no grau de resistência de plantas com os fungos está relacionado com a alta concentração de açúcar nos tecidos. As células corticais, próximas às células epidérmicas sofreram coalescência, resultando em depressão (Figura 1A), na qual, posteriormente, de acordo com Bailey *et al.* (1992) originar-se-ão acérvulos para a produção dos esporos. As alterações encontradas nos tecidos e a ausência de respostas de resistência indicaram a suscetibilidade do acesso de *S. capitata*.



**Figura 1** - Secções histopatológicas de caules do acesso de *Stylosanthes capitata*. A Coalescência de células da epiderme e do córtex (Co) e crescimento intrusivo (seta) em células corticais. B. Células da medula com granulação citoplasmática (Gc) e núcleos atrofiados (\*) no parênquima xilemático. C-D. Floema (Fl) com células alteradas, parênquima medular (Pm) com citoplasma denso, células degradadas (Cd) no xilema e tilose (Ti) em elementos de vaso. Barra - 50  $\mu$ m (A e C) e 25  $\mu$ m (B e D).

O *S. guianensis*, ao contrário do *S. capitata*, apresentou lesões superficiais e pequenas, compostas por células infectadas inconspícuas, com poucas alterações celulares (Figura 2). Entretanto, estas alterações foram observadas em todos os tecidos caulinares, concentrando-se na região do parênquima cortical, da epiderme e medula (Figura 2A). Os tecidos vasculares, mantiveram-se preservados, com poucas alterações no xilema (Figura 2B). A espécie apresenta respostas de resistência à infecção, evidenciadas pela agregação citoplasmática em células medulares (Figura 2C) e a presença de material reacional em espaços intercelulares na medula (Figura 2D). A ocorrência de agregação citoplasmática, associada à formação de papilas, foi observada neste mesmo patossistema sob conídios não-germinados em cultivares australianas (Munaut e Maraite, 1998).



**Figura 2** - Secções histopatológicas de caules *Stylosanthes guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão. A. Coalescência em células do córtex (Co) e do câmbio (Ca). B. Células da medula com granulação citoplasmática (Gc) e coalescência (Cl). C. Agregação citoplasmática (Ag) no parênquima medular. D. Agregação citoplasmática (Ag) na medula e material reacional (seta) em espaços intercelulares. Barra - 50  $\mu$ m (A e C) e 25  $\mu$ m (B e D).

Em nenhuma das espécies foi observada a ocorrência de reação de hipersensibilidade (RH). De acordo com Chakraborty (2004), a reação de RH está relacionada aos genes ligados à fase biotrófica do patógeno, assim como as reações histológicas ocorrem de 24 a 48 horas após a infecção em hospedeiros suscetíveis, incluindo a deposição e aposição de camadas celulares, agregação citoplasmática e escurecimento de parede e protoplasto.

As análises permitiram inferir que a cultivar Mineirão de *S. guianensis* tem elevado grau de resistência à antracnose. Tais informações corroboram com os resultados de reações desta cultivar à antracnose em trabalhos de inoculação artificial ou infecções naturais. Vários mecanismos de resistência de *Stylosanthes* à antracnose já foram relatados, em cultivares australianas, destacando-se a síntese de quitinase e  $\beta$ -glu-

canase (Brown e Davis, 1992), assim como de peroxidases (Ogle *et al.*, 1990; Sharp *et al.*, 1990; Munaut e Maraite, 1998). A composição da cutícula de algumas espécies de estilosantes também parece interferir na severidade da antracnose, tendo sido observado que, em algumas interações compatíveis, as hifas de infecção limitam sua colonização na cutícula do hospedeiro (Vinijsanum *et al.*, 1987). Entretanto, os mecanismos de resistência de cultivares brasileiras à antracnose ainda não estão completamente estabelecidos, justificando assim pesquisas adicionais.

#### 4. Conclusões

- O estudo histológico de lesões constitui importante ferramenta no entendimento do patossistema, pois reflete aspectos epidemiológicos do patógeno e revela muitas respostas da planta à infecção.

- As respostas à infecção e a formação de lesões caulinares são diferentes nas espécies de *Stylosanthes*.

- O *S. guianensis* var. *vulgaris* cv. Mineirão apresenta reação de resistência à antracnose, o que não é observado no acesso de *S. capitata*.

#### REFERÊNCIAS

- AMORIM, L. Colonização e reprodução. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de Fitopatologia: Princípios e Conceitos**. 3. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, 1995. p.307-324.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Melksham: Redwood Press, 1992. p.88-120.
- BROWN, A.E.; DAVIS, R.D. Chitinase activity in *Stylosanthes guianensis* systemically protected against *Colletotrichum gloeosporioides*. **Journal of Phytopathology**, Hamburgo, v.136, n.1, p.242-256, 1992.
- CHAKRABORTY, S. Anthracnose disease of *Stylosanthes*. In: CHAKRABORTY, S. **High-yielding anthracnose resistant Stylosanthes for agricultural systems**. Canberra: CSIRO, 2004. p.113-124.
- GARDENER, C.J. The dynamics of *Stylosanthes* pasture. In: STACE, H.M.; EDYE, L.A. **The Biology and Agronomy of Stylosanthes**. Centercourt: Academic Press, 1984. p.333-357.
- GERRITS, P.O. **The application of glycol metacrylate in histotechnology: some fundamental principles**. Leica GmbH, Germany, 1991. 80p.
- HETHERINGTON, S.D.; CHAKRABORTY, S.; THOMAS, M.; IRWIN, J.A.G. The relationship between anthracnose severity and populations of bacteria on the phylloplane of the tropical pasture legume *Stylosanthes scabra*. **Biological Control**, Orlando, v.5, n.1, p.39-46, 1995.
- IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F. Two diseases in *Stylosanthes* spp. caused by *Colletotrichum gloeosporioides* in Australia, and pathogenic specialization within one of the causal organisms. **Australian Journal of Agriculture Research**, Melbourne, v.29, n.1, p.305-317, 1978.
- IRWIN, J.A.G.; TREVORROW, P.R.; CAMERON, D.F. Histopathology of compatible interactions involving biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides* that causes anthracnose of *Stylosanthes* spp. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.32, n.6, p.631-640, 1984.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw Hill, 1940. 523p.
- MUNAUT, F.; MARAITE, H. Conidium germination and appressorium penetration of *Colletotrichum gloeosporioides* on *Stylosanthes guianensis*. **Journal of Phytopathology**, Hamburgo, v.146, n.1, p.19-26, 1998.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue. **Protoplasma**, New York, v.59, n.2, p.367-373, 1964.
- OGLE, H.J.; GOWANLOCK, D.H.; IRWIN, J.A.G. Infection of *Stylosanthes guianensis* and *S. scabra* by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, Palo Alto, v.80, n.9, p.80-87, 1990.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiro: mecanismo de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: Princípios e conceitos**. 3. ed. v.1. São Paulo: Ceres, 1995. p.417-453.
- SHARP, D.; BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G.; MANNERS, J.M. Biochemical and cytochemical responses of *Stylosanthes guianensis* to infection by *Colletotrichum gloeosporioides*: association of callose deposition with resistance. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.68, n. , p.505-511, 1990.

16. THOMAS, D.; LASCANO, C.E.; VERA, R.R. A tropical pasture legume for poor soils. **Span**, v.30, n.2, p.59-61, 1987.
17. VERZIGNASSI, J.R.; FERNANDES, C.D. **Estilosantes Campo Grande: Situação atual e perspectivas**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002. 2p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 7).
18. VINIJSANUM, T.; IRWIN, J.A.G.; CAMERON, D.F. Host range of three strains of *Colletotrichum gloeosporioides* from tropical pasture legumes, and comparative histological studies of interactions between type B disease producing strains and *Stylosanthes scabra* (non host) and *S. guianensis* (host). **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v.35, n.6, p.665-77, 1987.