

Relação entre a estrutura foliar de feijoeiro e a pré-infecção por *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*

Vanessa de Fátima Jerba⁽¹⁾, Roberto Antonio Rodella⁽²⁾ e Edson Luiz Furtado⁽³⁾

⁽¹⁾Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Fitopatologia, Caixa Postal 154, CEP 79002-970 Campo Grande, MS. E-mail: vjerba@cnpqg.embrapa.br
⁽²⁾Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências de Botucatu, Dep. de Botânica, Caixa Postal 510, CEP 18618-000 Botucatu, SP. E-mail: rodella@ibb.unesp.br
⁽³⁾Unesp, Fac. de Ciências Agrônômicas de Botucatu, Caixa Postal 237, CEP 18603-970 Botucatu, SP. E-mail: elfurtado@fca.unesp.br

Resumo – Os objetivos deste trabalho foram mensurar a área da nervura secundária e quantificar o número de tricomas da superfície foliar de cultivares de feijoeiro suscetível (Carioca), moderadamente resistente (Pérola) e resistente (IAPAR-81) à antracnose, e observar as relações entre tais características com o estágio pré-infeccional. Para mensurar a área da nervura secundária, fragmentos foliares foram amostrados, fixados em FAA 50, conservados em álcool 70%, infiltrados em resina glicol-metacrilato, cortados transversalmente e corados com azul de toluidina. Os tricomas foram quantificados em impressões epidérmicas em microscópio de projeção. Na análise pré-infeccional, o material foi fixado em glutaraldeído 2,5% e processado para o estudo ao microscópio eletrônico de varredura. A cultivar resistente apresentou menor área de nervura secundária e maior pilosidade que a cultivar moderadamente resistente e a suscetível. Na cultivar resistente, por causa da menor área de nervura e maior pilosidade, o patógeno permaneceu sobre a nervura e envolvido com o tricoma. Na cultivar suscetível, com maior área de nervura e menor pilosidade, foram observadas necrose e estruturas fúngicas na superfície foliar. Há relação entre estas características foliares e a resistência à antracnose durante o estágio pré-infeccional do patógeno.

Termos para indexação: *Phaseolus vulgaris*, antracnose do feijoeiro, superfície foliar, tigmotropismo, tricomas.

Relationship between bean leaf structure and the *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* preinfection

Abstract – The objectives of this work were to measure the secondary vein area and to quantify the trichomes of leaf surface in bean cultivar susceptible (Carioca), medium resistant (Pérola) and resistant (IAPAR-81) to anthracnose, and to observe relationships between leaf blade characteristics with the preinfectional stages. In order to measure the secondary vein area, sample leaf pieces were fixed in FAA 50 and conserved in 70% alcohol. These leaf samples were infiltrated in glycol metacrylate resin, cut transversally and stained with toluidine blue. The trichomes were quantified in epidermal impressions in projection microscopy. The material for preinfection analysis was fixed in 2.5% glutaraldehyde and processed to study the scanning electron microscopy. The resistant cultivar showed minor secondary vein area and high pilosity than the cultivar medium resistant and susceptible. In the resistant cultivar, due to minor vein area and high pilosity, the pathogen stayed on the vein and involved on the trichomes. In susceptible cultivar, with high vein and minor pilosity, necrosis and fungal structure on the leaf surface were observed. The results show a relation between the minor vein and high leaf trichomes quantity with the resistance to the anthracnose in pathogen preinfection stages.

Index terms: *Phaseolus vulgaris*, bean anthracnose, leaf surface, tigmotropism, trichomes.

Introdução

A antracnose do feijoeiro ocorre preferencialmente nas nervuras foliares e vagens e pode causar perdas de até 100% na produtividade, principalmente quando, além de se usar variedades suscetíveis em ambientes propícios à ocorrência da doença, são utilizadas sementes contaminadas (Somavilla & Prestes, 1999). Entre as doenças do feijoeiro, a antracnose é uma das mais prejudiciais, tendo como agente causal o fungo mitospórico

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Scrib., que corresponde ao teleomorfo *Glomerella cingulata* (Stoneman) Spauld. & Schrenk f.sp. *phaseoli* (Sutton, 1992).

Como o patógeno pode ser transmitido por sementes, seu controle é difícil, aumentando o inóculo em áreas produtoras (Vechiato et al., 1997), inviabilizando, muitas vezes, a produção. No controle dessa doença, a utilização de cultivares resistentes constitui-se no método mais viável (Rava et al., 1998). Entretanto, essa estratégia é

dificultada pela grande variabilidade do patógeno, que interfere na durabilidade da resistência da cultivar (Bianchini et al., 1997). Considerando o caráter assexual do patógeno, o mecanismo mais adequado no melhoramento genético é a piramidação de genes, que consiste na incorporação de vários genes de resistência em um único hospedeiro (Balardin, 2001).

Conforme Pascholati & Leite (1995) e Agrios (1997), mecanismos de resistência de um vegetal ao ataque patogênico são geralmente divididos em duas categorias, as quais são denominadas de pré-formados (passivos ou constitutivos) e pós-formados (ativos ou induzidos), sendo ambas classificadas, quanto à natureza, em estrutural e bioquímica.

Para analisar e avaliar os mecanismos de resistência de um patossistema, é necessário conhecer o modo de ataque do patógeno à planta hospedeira. Considerando que a antracnose é causada por um fungo com penetração direta nas células epidérmicas, torna-se imprescindível o estudo das características da superfície foliar. De acordo com Bailey et al. (1992) e Jiménez-Díaz (1996), a patogênese depende da resposta tigmotrópica do patógeno no reconhecimento da planta hospedeira, podendo ser esta resposta induzida por um estímulo físico (Epstein et al., 1985). Segundo estes autores, a maioria das reações de resistência está relacionada com a fase inicial do parasitismo; porém Landes & Hoffmann (1979), estudando o desenvolvimento pré-infeccional de *Colletotrichum lindemuthianum* em feijoeiro, observaram que a degradação enzimática da parede celular pela hifa infectiva apresentou a mesma intensidade nas cultivares com diferentes graus de resistência, durante o processo de penetração.

O objetivo deste trabalho foi mensurar a área da nervura secundária e quantificar o número de tricomas da superfície foliar de cultivares de feijão suscetível (Carioca), moderadamente resistente (Pérola) e resistente (IAPAR-81) à antracnose, e observar as relações entre tais características com o estágio pré-infeccional.

Material e Métodos

As cultivares utilizadas foram selecionadas de acordo com Canteri et al. (1999), ou seja, Carioca, Pérola e IAPAR-81, consideradas, respectivamente, suscetíveis, moderadamente resistentes e resistentes à antracnose. As sementes foram obtidas na Cooperativa Agropecuária Batavo, Carambeí, PR. A semeadura foi feita em vasos de plástico com substrato autoclavado,

mantidos em casa de vegetação à temperatura média de 24°C, por 25 dias.

Nas mensurações da área da nervura secundária, amostrou-se a região mediana do folíolo central do primeiro metafile e estas amostras foram fixadas em FAA 50 (formaldeído + ácido acético glacial + álcool 50%) por 48 horas (Johansen, 1940). Após esse período, o material foi transferido para solução de álcool 70%, sendo posteriormente desidratado em série etílica ascendente e infiltrados em resina glicol-metacrilato (Gerrits, 1991). O material foi seccionado transversalmente em micrótomo rotatório com 10 µm de espessura, e as seções foram submetidas à coloração com azul de toluidina (O'Brien et al., 1964).

Na quantificação dos tricomas, foram realizadas impressões epidérmicas com cola instantânea, determinado o número médio de tricomas por milímetro linear na região da nervura secundária e por milímetro quadrado na região internervural.

As mensurações de área da nervura e as determinações do número de tricomas foram realizadas em microscópio de projeção, utilizando-se três repetições por cultivar. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (Gomes, 1990).

O fungo *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli* raça kapa foi cultivado em meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar) e em MVI (meio de vagem inteira) (Dalla Pria, 1997). A inoculação foi efetuada por deposição de microgotas com 50 mL de inóculo no terço médio abaxial da nervura secundária de folíolos centrais, destacados do primeiro metafile, sendo a concentração do inóculo de $2,0 \times 10^4$ conídios mL⁻¹. Depois de inoculados, os folíolos foram mantidos dentro de placas de Petri com o peciólulo envolto com algodão umedecido, sob condições controladas de fotoperíodo de 12 horas e temperatura de 21±2°C em estufa tipo BOD, por cinco dias. As coletas das amostras foram efetuadas 24, 72 e 120 horas após a inoculação (Benhamou et al., 1991).

O estudo ao microscópio eletrônico de varredura foi realizado com fragmentos coletados nos períodos referidos anteriormente. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3, e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,3 (Robards, 1978). A seguir, o material foi desidratado em série de acetona, submetido à secagem em ponto crítico e, finalmente, metalizado em ouro, sendo então analisado em microscópio eletrônico de varredura "Philips SEM 515".

Resultados e Discussão

Características estruturais do limbo foliar

A área da nervura secundária foi maior na cultivar Carioca e menor nas cultivares Pérola e IAPAR-81 (Tabela 1). A preferência do patógeno pelas nervuras foliares de feijoeiro (Bianchini et al., 1997; Somavilla & Prestes, 1999) pode estar relacionada com nervuras mais salientes na cultivar suscetível (Carioca) à antracnose, sugerindo que estas atuam como um estímulo físico ao tubo germinativo, o que facilita o processo de penetração. De acordo com Jiménez-Díaz (1996), a patogênese depende da topografia da superfície da planta hospedeira. Segundo Bentes & Matsuoka (2002), as diferenças no processo de pré-infecção não dependem apenas do conídio, mas também das mudanças da topografia do hospedeiro, o que se caracteriza como uma sinalização na diferenciação das estruturas fúngicas.

A cultivar Carioca apresentou menor número de tricomas na região internervural e na nervura secundária, ao passo que a cultivar IAPAR-81 mostrou maior número e a cultivar Pérola, valores intermediários (Tabela 1). A maior pilosidade dos órgãos pode proporcionar aumento na proteção a insetos transmissores de vírus, além de evitar a formação do filme de água necessário à multiplicação de bactérias e à germinação fúngica (Pascholati & Leite, 1995; Agrios, 1997).

Houve ausência de ceras epicuticulares na superfície foliar das três cultivares (Figuras 1 a 3). As características cuticulares, como a espessura da cutícula e a sua composição, podem apresentar relação com o grau de resistência aos patógenos com penetração direta, considerando que a cutícula constitui uma barreira física e química à penetração fúngica, assim

Tabela 1. Área ($\times 10^2$ mm²) da nervura secundária, número de tricomas por milímetro quadrado da região internervural e número de tricomas por milímetro linear da nervura secundária, da face abaxial do folíolo central de cultivares de feijoeiro⁽¹⁾.

| Cultivares | Área da nervura secundária | Número de tricomas da região internervural | Número de tricomas da nervura secundária |
|------------|----------------------------|--|--|
| Carioca | 75,52a | 12,63b | 6,99b |
| Pérola | 17,50b | 18,94ab | 9,44ab |
| IAPAR-81 | 14,60b | 21,50a | 10,56a |
| CV (%) | 51,67 | 9,23 | 7,02 |

⁽¹⁾Médias seguidas de mesma letra, nas colunas, não diferem entre si a 5% de probabilidade pelo teste de Tukey.

como os tricomas glandulares mediante a liberação de compostos antimicrobianos (Binyamini & Schiffmann-Nadel, 1972; Bell, 1981; Aist, 1983; Manandhar et al., 1995).

As avaliações das características estruturais da superfície foliar revelaram que as nervuras menos salientes, associadas com o aumento da pilosidade, contribuíram para maior resistência à penetração de *G. cingulata* f.sp. *phaseoli*.

Análise pré-infeccional

Após 24 horas da inoculação, foi observado o desenvolvimento inicial do patógeno (Figura 1). Na cultivar suscetível (Carioca), verificou-se a presença de conídios não germinados com uma delgada matriz extracelular secretada por estes esporos (Figura 1, A). De acordo com Bailey et al. (1992), essa matriz apresenta em sua composição polissacarídeos, glicoproteínas e enzimas

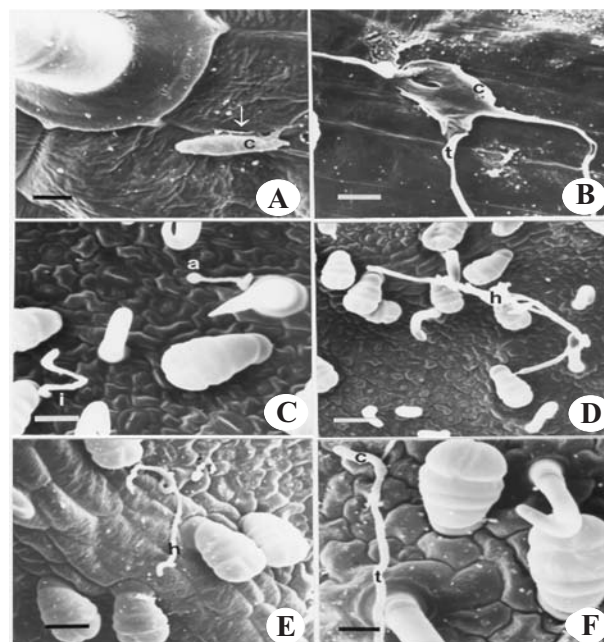


Figura 1. Superfície abaxial foliar de cultivares de *Phaseolus vulgaris*, 24 horas após a inoculação de *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. A: 'Carioca' – conídio (c) exibindo matriz extracelular (seta); B: 'Carioca' – conídio desintegrado (c) com tubos germinativos (t); C: 'Pérola' – conídios com tubo germinativo formando apressório (a) e com intumescimento (i) de hifa na base do tricoma glandular; D: 'Pérola' – hifas (h) envolvidas com os tricomas; E: 'IAPAR-81' – hifas (h) desenvolvidas sobre a nervura foliar; F: 'IAPAR-81' – conídio (c) com longo tubo germinativo (t) e ausência de apressório. Barras representam 4 μ m, 8 μ m, 15 μ m, 31 μ m, 20 μ m e 12 μ m em A, B, C, D, E e F, respectivamente.

que participam da degradação da parede celular vegetal. Epstein et al. (1985) atribuem às proteínas da matriz do tubo germinativo a função de resposta tigmotrópica no reconhecimento da superfície do hospedeiro. Neste mesmo período de avaliação, a cultivar suscetível (Carioca) apresentou tubo germinativo sobre a superfície da nervura secundária, bem como conídio desintegrado com a emissão de tubos germinativos (Figura 1, B). Não foi observada a formação do apressório neste período de avaliação, sendo visível apenas um leve intumescimento da ponta das hifas.

A cultivar moderadamente resistente (Pérola), 24 horas após a inoculação, apresentou a formação de apressório com formato esférico; entretanto, em outro tubo germinativo, o apressório não é formado, sendo visível, porém, um intumescimento da sua ponta (Figura 1, C). A variação nas estruturas de infecção é comum em vários patossistemas, como foi observado por Graaf et al. (2002) na patogênese de *Phoma clematidina*. Segundo esses autores, a base dos tricomas glandulares pode ser um ponto suscetível à infecção. A penetração das hifas, nesta região, foi observada na cultivar moderadamente resistente (Figura 1, C). No mesmo período avaliado ocorrem hifas envolvidas com os tricomas, as quais crescem sobre estas estruturas, não estabelecendo contato com as células epidérmicas (Figura 1, D). Na fase inicial da infecção, a formação de apressórios apresenta diferenças temporais e quantitativas em cultivares resistentes e suscetíveis, sendo constatado nas cultivares suscetíveis maior número desta estrutura de infecção (Ferreira & Rijkenberg, 1991).

A cultivar resistente (IAPAR-81) apresentou menor área de nervura e, conseqüentemente, nervura menos saliente, o que parece dificultar o reconhecimento da superfície foliar por meio de resposta tigmotrópica do patógeno (Tabela 1). Após 24 horas da inoculação, observou-se o desenvolvimento das hifas sobre a nervura, porém sem indícios de penetração, sendo também observada a formação de um único tubo germinativo por conídio (Figura 1, E). Nessa cultivar também se verifica a presença de hifas envolvidas nos tricomas (Figura 1, F), corroborando Pascholati & Leite (1995) e Agrios (1997), os quais afirmam que a pilosidade foliar relaciona-se com a proteção a patógenos, evitando o contato destes com a planta hospedeira.

Após 72 horas da inoculação, foi observada a progressão do fungo sobre a superfície foliar (Figura 2). Na cultivar suscetível (Carioca), ocorreram necroses foliares com desidratação dos tecidos, indicando o início da colonização do hospedeiro (Figura 2, A e B). As lesões necróticas ocorrem por causa da desidratação e da perda de nutrientes inorgânicos e orgânicos pela célula vegetal (Griffey & Leach, 1965).

A cultivar moderadamente resistente (Pérola), 72 horas após a inoculação, não apresentou sinais de colonização em seus tecidos, mostrando apenas hifas envolvidas nos tricomas (Figura 2, C) e a germinação de conídio com vários tubos germinativos (Figura 2, D). A emissão de vários tubos germinativos pelos conídios pode ocorrer em interações compatíveis (Bailey et al., 1992).

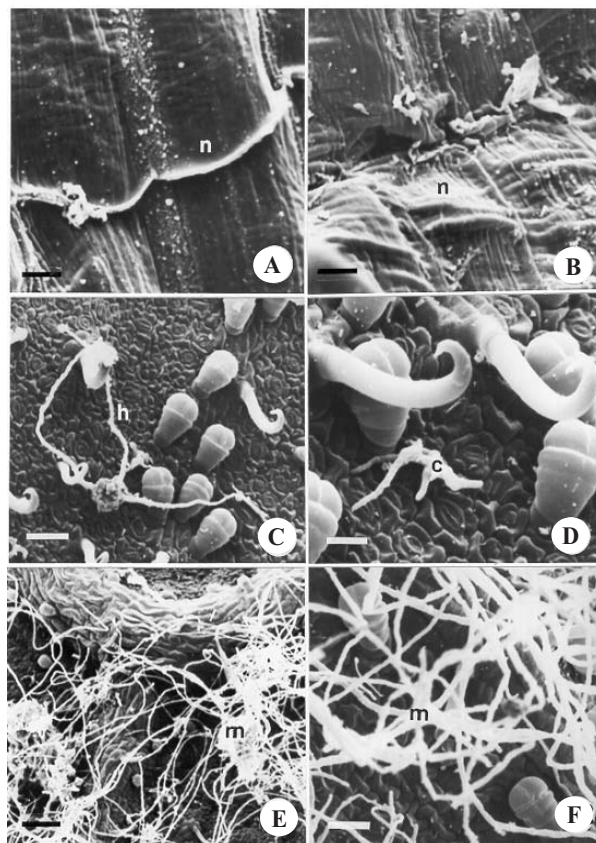


Figura 2. Superfície abaxial foliar de cultivares de *Phaseolus vulgaris*, 72 horas após a inoculação de *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. A e B: 'Carioca' – necrose foliar (n) com desidratação dos tecidos; C: 'Pérola' – hifas (h) envolvidas com os tricomas; D: 'Pérola' – conídio (c) com vários tubos germinativos; E e F: 'IAPAR-81' – extenso micélio (m) sobre a superfície foliar, sem ocorrência de penetração. Barras representam 4 μ m, 4 μ m, 31 μ m, 14 μ m, 90 μ m e 22 μ m em A, B, C, D, E e F, respectivamente.

Na cultivar resistente (IAPAR-81), a maior pilosidade, associada com nervuras pouco salientes, sugere maior proteção da planta contra a invasão do patógeno. O extenso desenvolvimento micelial sobre a superfície foliar e a ausência de sinais de colonização, observada 72 horas após a inoculação, sustentam esta hipótese (Figura 2, E e F).

No patossistema avaliado existe relação entre a densidade dos tricomas e a resposta de resistência. Apesar disso, Fiume (1994) constatou que o número de tricomas não se relaciona com a resistência, no caso da ferrugem do feijoeiro, causada pelo fungo *Uromyces appendiculatus*. Deve-se considerar que neste patossistema, a penetração do patógeno ocorre por meio dos estômatos e não diretamente pelas células epidérmicas, como ocorre na antracnose. Desta forma, os tricomas não apresentaram relação com a resistência à ferrugem.

Após 120 horas de inoculação, a cultivar suscetível (Carioca) apresentou destruição dos tecidos, caracterizada por acentuada necrose (Figura 3, A), bem como espesso micélio na região da nervura secundária, o qual penetra diretamente nas paredes anticlinais das células do complexo estomático, sem a formação de apressório (Figura 3, B). De acordo com Ogle et al. (1990), em espécies de *Stylosanthes*, as hifas subcuticulares de *Colletotrichum gloeosporioides* podem iniciar nova infecção sem a formação do apressório, pois essas hifas emergem do próprio tecido infectado.

Na cultivar moderadamente resistente (Pérola), foi observado pouco micélio sobre os tricomas, sem indício de colonização tissular, ou seja, não havendo necroses evidentes (Figura 3, C e D).

A cultivar moderadamente resistente (Pérola) e a resistente (IAPAR-81), após 120 horas de inoculação, apresentaram pouco micélio sobre a superfície dos tricomas. A cultivar resistente apresentou muitas partículas sobre a superfície foliar, sinalizando uma possível degradação do extenso micélio (Figura 2, E e F), como também não mostrou indícios de penetração no tecido da planta hospedeira (Figura 3, E e F). A presença de partículas na superfície da cultivar resistente pode ser atribuída à ação de bactérias, as quais contribuem para a degradação do micélio (Mercer et al., 1975).

Constatou-se que a ocorrência de nervuras secundárias mais salientes associadas com a menor pilosidade foliar estão relacionadas com o desenvolvimento inicial do patógeno, podendo influenciar na penetração deste nos tecidos foliares. Essas características estruturais do limbo foliar interferem de forma significativa na resposta da cultivar à infecção pelo patógeno e, conseqüentemente, no grau de suscetibilidade das cultivares de feijoeiro estudadas.

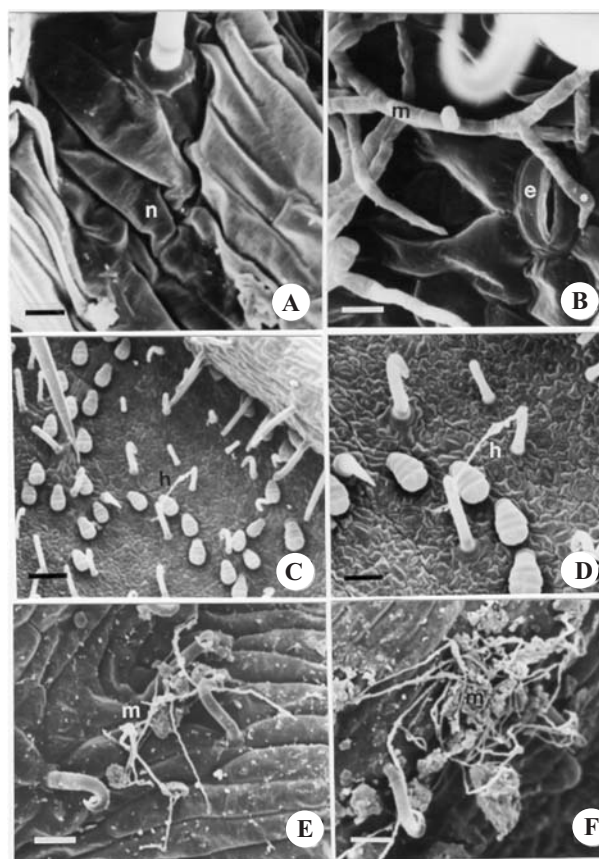


Figura 3. Superfície abaxial foliar de cultivares de *Phaseolus vulgaris*, 120 horas após a inoculação de *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. A: 'Carioca' – necrose (n) acentuada na região da nervura secundária; B: 'Carioca' – micélio (m) com hifas infectivas (*) penetrando na parede anticlinal do complexo estomático (e); C e D: 'Pérola' – escassas hifas (h) envolvidas com os tricomas; E: 'IAPAR-81' – degradação do extenso micélio (m) ocorrente em 72 horas após a inoculação; F: 'IAPAR-81' – ausência de infecção. Barras representam 16 μ m, 8 μ m, 66 μ m, 33 μ m, 30 μ m e 30 μ m em A, B, C, D, E e F, respectivamente.

Conclusões

1. A estrutura do limbo foliar das cultivares de feijoeiro está relacionada com o comportamento do patógeno durante o processo pré-infeccional.

2. O grau de resistência da cultivar apresenta relação com a saliência das nervuras e a pilosidade foliar.

Referências

- AGRIOS, G.N. How plants defend themselves against pathogens. In: AGRIOS, G.N. (Ed.). **Plant Pathology**. 4th ed. California: Academic Press, 1997. p.93-114.
- AIST, J.R. Structural responses as resistance mechanisms. In: BAILEY, J.A.; DEVERALL, B.J. (Ed.). **The dynamics of host defense**. New York: Academic Press, 1983. p.33-70.
- BAILEY, J.A.; O'CONNELL, R.J.; PRING, R.J.; NASH, C. Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p.88-120.
- BALARDIN, R.S. Coevolução entre plantas e patógenos. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, v.9, p.159-176, 2001.
- BELL, A.A. Biochemical mechanisms of disease resistance. **Annual Review of Plant Physiology**, v.32, p.21-81, 1981.
- BENHAMOU, N.; LAFITTE, C.; BARTHE, J.P.; ESQUERRÉ-TUGAYÉ, M.T. Cell surface interaction between bean leaf cells and *Colletotrichum lindemuthianum*: cytochemical aspects of pectin breakdown and fungal endopolygalacturonase accumulation. **Plant Physiology**, v.97, p.234-244, 1991.
- BENTES, J.L.S.; MATSUOKA, K. Histology of *Colletotrichum guaranicola* and *Paullinia cupuana* var. *sorbilis* on resistant and susceptible clones. **Fitopatologia Brasileira**, v.27, p.71-77, 2002.
- BIANCHINI, A.; MARINGONI, A.C.; CARNEIRO, S.M.T.P.G. Doenças de feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L.E.A.; REZENDE, J.A.M. (Ed.). **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1997. v.2, p.376-399.
- BINYAMINI, N.; SCHIFFMANN-NADEL, M. Latent infection in avocado fruit due to *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, v.62, p.592-594, 1972.
- CANTERI, M.G.; DALLA PRIA, M.; SILVA, O.C. **Principais doenças fúngicas do feijoeiro: orientações para manejo econômico e ecológico**. Ponta Grossa: UEPG, 1999. 178p.
- DALLA PRIA, M. **Quantificação de parâmetros monocíclicos da antracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*) e da mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola*) do feijoeiro**. 1997. 82p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- EPSTEIN, L.; LACETTI, L.; STAPLES, R.C.; HOCH, H.C.; HOOSE, W.A. Extracellular proteins associated with induction of differentiation in bean rust uredospore germ lings. **Phytopathology**, v.75, p.1073-1076, 1985.
- FERREIRA, J.F.; RIJKENBERG, F.H. Ultrastructural morphology of *Uromyces transversalis* infection of resistant and susceptible gladiolus host and a nonhost *Zea mays*. **Phytopathology**, v.81, p.596-602, 1991.
- FIUME, F. Individuazione di varietà di *Phaseolus vulgaris* L. e di *Phaseolus coccineus* L. con la resistenza verso *Uromyces appendiculatus* (Pers.) Unger. **Informatore Fitopatologico**, v.44, p.49-57, 1994.
- GERRITS, P.O. **The application of glycol methacrylate in histotechnology: some fundamental principles**. Netherlands: Department of Anatomy and Embryology, State University of Groningen, 1991. 80p.
- GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. 13.ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 467p.
- GRAAF, P. van de; JOSEPH, M.E.; CHARTIER-HOLLIS, J.M.; O'NEIL, T.M. Prepenetration stages in infection of clematis by *Phoma clematidina*. **Plant Pathology**, v.51, p.331-337, 2002.
- GRIFFEY, R.T.; LEACH, J.G. The influence of age of tissue on the development of bean anthracnose lesion. **Phytopathology**, v.55, p.915-918, 1965.
- JIMÉNEZ-DÍAZ, R.M. Interacciones planta-hongo: mecanismos de infección, patogénesis y resistencia. In: LLÁCER, G.; LÓPEZ, M.M.; TRAPERO, A.; BELLO, A. (Ed.). **Patología vegetal**. Valencia: Sociedad Española de Fitopatología, 1996. p.739-769.
- JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940. 523p.
- LANDES, M.; HOFFMANN, G.M. Zum keimung- und infektionsverlauf bei *Colletotrichum lindemuthianum* auf *Phaseolus vulgaris*. **Phytopathologische Zeitschrift**, v.95, p.259-273, 1979.
- MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L.; WANG, T.C. Anthracnose development on pepper fruits inoculated with *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Disease**, v.79, p.380-383, 1995.
- MERCER, P.C.; WOOD, R.K.; GREENWOOD, A.D. Ultrastructure of the parasitism of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, v.5, p.203-214, 1975.
- O'BRIEN, T.P.; FEDER, N.; McCULLY, M.E. Polychromatic staining of plant cell walls by Toluidine Blue. **Protoplasma**, v.59, 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**, v.80, p.837-842, 1990.
- PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B. Hospedeiros: mecanismos de resistência. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIN, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3.ed. São Paulo: Ceres, 1995. v.1, p.417-453.
- RAVA, C.A.; SARTORATO, A.; BOTELHO, S.A. Eficiência "in vitro" e "in vivo" de fungicidas no controle de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.45-48, 1998.

ROBARDS, A.W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J.L. (Ed.). **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p.343-444.

SOMAVILLA, L.L.; PRESTES, A.M. Identificação de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* de algumas regiões do Rio Grande do Sul. **Fitopatologia Brasileira**, v.24, p.416-421, 1999.

SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p.1-26.

VECHIATO, M.H.; KOHARA, E.Y.; MENTEN, J.O.M. Transmissão de *Colletotrichum lindemuthianum* em sementes de feijoeiro comum. **Summa Phytopathologica**, v.23, p.265-269, 1997.

Recebido em 16 de julho de 2004 e aprovado em 22 de novembro de 2004