

MARÍA GABRIELA ROCA MAGALLANES

ASPECTOS CITOLÓGICOS DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM
Glomerella cingulata (Stonem.) Spauld & Schrenck f. sp. *phaseoli*
(*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner).

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção de título de "Mestre".

Orientadora

Prof.^a Dr.^a LISETE CHAMMA DAVIDE

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL
1997

15501

MA 127702

MARÍA GABRIELA ROCA MAGALLANES

ASPECTOS CITOLÓGICOS DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM

Glomerella cingulata (Stonem.) Spauld & Schrenck f. sp. *phaseoli*

(*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner).

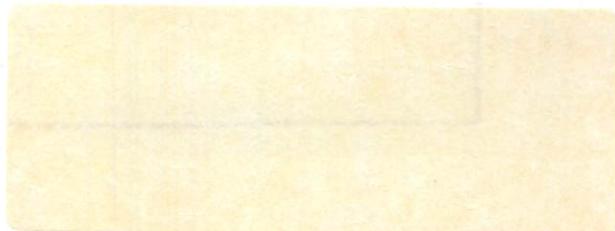
Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção de título de "Mestre".

Orientadora

Prof.^a Dr.^a LISETE CHAMMA DAVIDE

LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL

1997



**Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Classificação e Catalogação da
Biblioteca Central da UFLA**

Roca Magallanes, María Gabriela.

Aspectos Citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.)
Spauld. & Schrenck f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn)
Scribner) // María Gabriela Roca Magallanes. -- Lavras : UFLA, 1997.

82 p. : il.

Orientador: Lisete Chamma Davide
Dissertação (Mestrado) - UFLA
Bibliografia

1. *Glomerella cingulata* - variação. 2. Citologia. 3. Citogenética. 4. Genética. 5.
Coloração de núcleo. 6. Fungo Fitopatogênico. 7. *Colletotrichum lindemuthianum*. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-581.158

-589.23

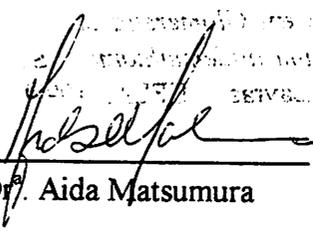
-589.24

MARÍA GABRIELA ROCA MAGALLANES

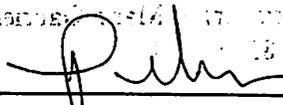
**ASPECTOS CITOLÓGICOS DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM *Glomerella*
cingulata (Stonem.) Spauld. & Schrenck. f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum*
(Sacc. & Magn) Scribner)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção de título de "Mestre".

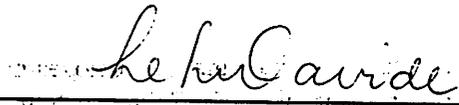
APROVADA em 11 de julho de 1997



Prof.^a Dr.^a Aida Matsumura



Prof. Dr. José da Cruz Machado



Prof.^a Dr.^a Lisete Chamma Davide

(Orientador)

Aos meus pais, Victor Manuel Roca e Carmen Teresa Magallanes

Aos meus irmãos, Victor Rafael e María Fabiola

Ao meu noivo, Adelar Jeferson

DEDICO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Av. das Nações Unidas, s/n - Jd. Anália Costa - São Carlos - SP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Física - Caixa Postal 1356 - São Carlos - SP

Telefone: (019) 210-7100 - Telex: 1356 - São Carlos - SP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Física - Caixa Postal 1356 - São Carlos - SP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Física - Caixa Postal 1356 - São Carlos - SP

Departamento de Física - Caixa Postal 1356 - São Carlos - SP

Departamento de Física - Caixa Postal 1356 - São Carlos - SP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Departamento de Física - Caixa Postal 1356 - São Carlos - SP

INSTITUTO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Agradecimentos

A Deus, por tudo.

Aos meus pais e irmãos pelo constante incentivo, confiança e apoio.

Ao meu noivo Adelar Jeferson Soligo pelo grande amor, dedicação, paciência, apoio, confiança e valiosa ajuda durante o curso.

À Professora Lisete Chamma Davide e às Pesquisadoras Maria Cristina Mendes-Costa e Maria das Graças Ongarelli pela orientação na condução do trabalho, amizade, respeito e valiosos ensinamentos.

Ao amigo Carlos do Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas (IVIC) pela colaboração nas buscas bibliográficas.

Aos Professores Eduardo Bearzoti, Rosane Schwan, Magno Ramalho e José da Cruz Machado pela colaboração e sugestões.

À amiga e colaboradora Ana Hortênsia, pelo apoio, amizade e ajuda no laboratório.

À amiga Giovanna Valli Braile e sua família, pelo constante apoio durante todo o curso.

Aos amigos Giovana, Haroldo, Glauber, Jaime, Vânia, Juscélio, pela agradável convivência, ajuda mutua e amizade.

Aos amigos de curso e companheiros de laboratório Mívia, Barbara, Rose, Ivan, Ruperts, Flavia, Leonardo, Patricia, Renata, Vespasiano e Cristian pela convivência e amizade.

À Universidade Federal de Lavras - UFLA, especialmente ao Departamento de Biologia pela oportunidade de realização do curso.

Ao Centro Nacional de Pesquisa (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo.

Aos professores de Departamento de Biologia pelos ensinamentos, amizade e consideração recebidas.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

1. The first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

2. The second part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

3. The third part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

4. The fourth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

5. The fifth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

6. The sixth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

7. The seventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

8. The eighth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

9. The ninth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

10. The tenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

11. The eleventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

12. The twelfth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

13. The thirteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

14. The fourteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

15. The fifteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

16. The sixteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

17. The seventeenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

18. The eighteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

19. The nineteenth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

20. The twentieth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

21. The twenty-first part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

22. The twenty-second part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

23. The twenty-third part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

24. The twenty-fourth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

25. The twenty-fifth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

26. The twenty-sixth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

27. The twenty-seventh part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

28. The twenty-eighth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

29. The twenty-ninth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

30. The thirtieth part of the document is a list of names and addresses of the members of the committee.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
RESUMO	xvii
ABSTRACT.....	xix
CAPÍTULO 1	1
1.1 INTRODUÇÃO	1
1.2 REFERENCIAL TEORICO	4
1.2.1 Forma Meiospórica	5
1.2.2 Forma Mitospórica	7
1.2.3 Fontes de variabilidade em fungos	8
1.2.3.1 Troca de material genético	9
1.2.3.2 Ciclo Parassexual	10
1.2.3.3 Polimorfismo Cromossômico	14
1.2.4 Ultraestrutura do Núcleo	16
CAPÍTULO 2	18
CITOGENÉTICA DE <i>Glomerella cingulata</i> (Stonem.) Spauld. & Schrenck. f. sp. <i>phaseoli</i>	

2.1 INTRODUÇÃO	18
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	19
2.2.1 Isolados	19
2.2.2 Preparações citológicas	20
2.2.2.1 Avaliações citológicas	20
2.2.2.2 Fotomicrografias	20
2.2.3 Análise estatística	21
2.3 RESULTADOS	23
2.3.1 Formação dos Ascos	23
2.3.2 Divisão celular no asco	23
2.3.2.1 Meiose	23
2.3.2.2 Mitose	26
2.3.3 Formação dos ascósporos	27
2.3.3.1 Isolado 1013	27
2.3.3.2 Isolado 531	27
2.3.4 Características dos ascósporos	29
2.4 DISCUSSÃO	30
2.4.1 Formação dos ascos	31
2.4.2 Divisão celular no asco	32
2.4.3 Formação e características dos ascósporos	34
2.5 CONCLUSÕES	37
CAPÍTULO 3	38

POTENCIAL DE VARIAÇÃO EM *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner: DEMONSTRAÇÃO CITOLÓGICA.

3.1 INTRODUÇÃO	38
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.2.1 Isolados	39
3.2.2 Cruzamentos a nível vegetativo	40
3.2.3 Preparações citológicas	40
3.2.4 Avaliações citológicas	42
3.2.5 Fotomicrografias	43
3.2.6 Análises estatísticas	43
3.3 RESULTADOS	45
3.3.1 Características gerais	45
3.3.2 Características do encontro vegetativo entre isolados	48
3.3.3 Características dos conídios em dormência	50
3.3.4 Características dos conídios em divisão	51
3.3.4.1 Isolado 1013	51
3.3.4.2 isolado 531	51
3.3.4.3 Isolado 1002	55
3.4 DISCUSSÃO	57
3.4.1 Características do micélio vegetativo	57
3.4.2 Produção e características de conídios	58
3.4.2.1 Produção de conídios	58

3.4.2.2 Características dos conídios	59
3.4.3 Fontes com potencial de variação: evidências citológicas	61
3.4.3.1 Troca de material nuclear através de anastomose entre conídios	61
3.4.3.2 Polimorfismo cromossômico	62
3.4.3.3 Ciclo parassexual	66
3.5 CONCLUSÕES	70
CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72
APÊNDICE	82

LISTA DE TABELAS

TABELA	página
1	Isolados de <i>G. cingulata</i> f. sp. <i>phaseoli</i> utilizados. UFLA, Lavras, 1997 19
2	Tratamentos aplicados para coloração de núcleos e cromossomos em ascos e ascósporos nos diferentes isolados avaliados. UFLA, Lavras, 1997..... 21
3	Esquema da análise de variância entre e dentro de isolados, com os graus de liberdade e esperanças dos quadrados médios. UFLA, Lavras, 1997..... 22
4	Resumo da ANAVA para comprimento e largura dos ascósporos dos isolados 1010, 1013 e 531, em meio de cultura. UFLA, Lavras, 1997..... 29
5	Médias do comprimento e largura em micrômetros (μm) de ascósporos com menos de 17 dias em meio M_3 . UFLA, Lavras, 1997..... 30
6	Estimativas dos parâmetros para a amostragem dos ascósporos. UFLA, Lavras, 1997..... 30
7	Isolados de <i>C. lindemuthianum</i> utilizados. UFLA, Lavras, 1997..... 40

8	Tratamentos aplicados para coloração de núcleos e cromossomos em conídios e hifas nos diferentes isolados avaliados. UFLA, Lavras, 1997.....	41
9	Esquema da análise de variância entre e dentro de isolados, com os graus de liberdade e esperanças dos quadrados médios. UFLA, Lavras, 1997.....	44
10	Esquema da análises de variância e esperanças matemáticas dos quadrados médios do número de cromossomos nos conídios do isolado 1013. UFLA, Lavras, 1997.....	45
11	Média do comprimento e largura em micrômetros (μm) dos conídios e porcentagem dos conídios binucleados nos isolados com menos de 15 dias, em meio M_3 . UFLA, Lavras, 1997.....	46
12	Resultado dos cruzamentos entre isolados em BDA e celofane, com avaliação do crescimento helicoidal e formação de anastomoses entre hifas. UFLA, Lavras, 1997	48
13	Resumo da ANAVA do comprimento e largura dos conídios nos isolados 1007, 1003, 1002, 531, 1010 e 1013. UFLA, Lavras, 1997	50
14	Estimativas dos parâmetros para a amostragem dos conídios com menos de 15 dias. UFLA, Lavras, 1997.....	51
15	Resumo da ANAVA para o número de cromossomos/núcleo em conídios do isolado 1013 em 30 dias de cultura. UFLA, Lavras, 1997	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		página
1	<p>a - Isolado 1013, células enveladas e núcleo depois da fusão (seta); b - paquíteno do isolado 1013 mostrando nucléolo (seta); c - asco do isolado 1013 com 4 ou 5 cromossomos; d - asco (seta) do isolado 531 mostrando 1 núcleo em prófase II, 2 núcleos em metáfase II e 2 núcleos em interfase da mitose; e - asco do isolado 531 com 5 cromossomos, f - telófase mitótica do isolado 1013; g - núcleos desordenados no asco do isolado 531; h - núcleos ordenados no asco do isolado 531. UFLA, Lavras, 1997 .</p>	25
2	<p>a - Liberação de ascósporos no isolado 531; b - ascos no peritécio do isolado 531; c - isolado 531 com ascósporos em vários graus de maturação; d - peritécio maduro do isolado 1013; e - placa (9 cm de diâmetro) com meio de cultura formando peritécios, isolado 531. UFLA, Lavras, 1997</p>	28
3	<p>a - Isolado 1002: 15 dias em BDA com celofane, apressórios binucleados; b - isolado 531: 15 dias em BDA com celofane, produção</p>	

	de conídios em fialides. UFLA, Lavras, 1997	47
4	Meio BDA com celofane (a) Isolado 1002 15 dias; (b) crescimento helicoidal: isolados 1007 x 1013 4 dias; (c) anastomoses: isolados 531 x 1013 4 dias UFLA, Lavras, 1997	49
5	a - número de conídios x número de cromossomos, no isolado 1013. Amostra de uma placa com meio M ₃ de cultura; b - número de conídios x número de cromossomos, nos isolados 531, 1002 e 1013 em meio de cultura M ₃ . UFLA, Lavras, 1997	52
6	a - Isolado 1013: conídios com 5 cromossomos; b - isolado 531: conídio germinando; c - isolado 531: conídio binucleado com ambos núcleos em prófase; d - isolado 531: conídio com 3 micronúcleos; e - isolado 531: conídio com 7 cromossomos; f - isolado 531: fusão de núcleos; g - isolado 531: 2 pontes, presença de micronúcleos; h - isolado 1002: Anastomose e conídios com 2 e 3 núcleos; i - isolado 1002: Anastomose e passagem de núcleo. UFLA, Lavras, 1997	54
7	Isolado 1002 com 30 dias em meio M ₃ . a - conídio com 4 cromossomos e nucléolo; b - conídio com 5 cromossomos; c - conídio com 6 cromossomos. UFLA, Lavras, 1997	56
8	Sugestão para o ciclo de vida de <i>C. lindemuthianum</i> : Ciclo assexual (azul); Ciclo sexual (vermelho); Ciclo parassexual (violeta) e Ciclo na natureza (verde). UFLA, Lavras, 1997.....	67

RESUMO

ROCA MAGALLANES, María Gabriela. Aspectos citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner). Lavras: UFLA, 1997. 82 p. (Dissertação - Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).

O estudo da variabilidade nos fungos fitopatogênicos é importante tanto para o conhecimento da genética do fungo, como para se ter o conhecimento básico necessário para a condução de programas de melhoramento de plantas e desenvolvimento de cultivares resistentes. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner (forma mitospórica) é encontrado na natureza ocasionando antracnose no feijoeiro. No entanto, em condições de laboratório pode ser encontrada sua forma meiospórica: *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. Nos fungos ocorrem uma série de fenômenos a nível citológico que permitem fazer inferência ao comportamento genético do fungo. Sabe-se que nesta espécie, em condições de laboratório, pode ocorrer recombinação sexual de forma espontânea, e heterocariose de forma induzida.

Este trabalho teve como objetivo detectar mecanismos com potenciais de variação, que possam ajudar a explicar a alta variabilidade genética apresentada por este patógeno. Foram

* Orientadora: Lisete Chamma Davide. Membros da banca: Aida T.S. Matsumura, José da Cruz Machado.

realizados estudos citológicos em *C. lindemuthianum* e sua forma meiospórica, em condições de laboratório. A maioria dos resultados foi obtida com a utilização da mistura de corantes carmin-orceína propiônica.

Os resultados mostraram 4 cromossomos para a espécie e de forma mais freqüente uma meiose normal. Também foi demonstrado, na forma mitospórica, a ocorrência de três fenômenos que se constituem em potencial de variação genética: troca de material nuclear nas anastomoses entre conídios, polimorfismo cromossômico e os passos citológicos necessários para ocorrência do ciclo parassexual.

ABSTRACT

CYTOLOGICAL ASPECTS OF THE GENETIC VARIABILITY IN *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld & Schrenck f. sp. (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner)

The study of variability of phytopathogenic fungi is important for knowing the genetics of this group of organisms so as to provide the basic requirement for the conduction of plant breeding programs and development of resistant cultivars. *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn) Scribner (mitosporic form) is found in nature causing anthracnose disease in beans, although the meiosporic form is found in culture as *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*. At the cytological level a series of phenomena which permits to understand the genetic fungal behaviour occurs. In culture it is known that the sexual recombination may occur spontaneously in this pathogen as well as heterokaryosis by induction.

This work had the objective to detect the potential of variability of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, which may help to explain the high genetic variability presented by this pathogen. Cytological studies in the mitosporic and meiosporic forms of the fungus were carried out in culture. The majority of the microscopic observations were based on the fungal structures stained with the mixture propio-carmin-orcein.

The results showed that *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* presents 4 chromosomes and the normal meiosis process is more frequent than the abnormal process. Under the cytological view it was also demonstrated that in the mitosporic form three phenomena, the nuclear material changes between conidial anastomosis, chromosome polymorphism and the necessary cytological steps to occur the parasexual cycle, which constitute potential for genetics variability were observed.

CAPÍTULO 1

1.1 INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum, doença de maior importância desta cultura (Rava e Sartorato, 1994). Perdas ocasionadas por este patógeno podem ser totais quando são utilizadas sementes infectadas e as condições de ambiente lhes são favoráveis. A utilização de cultivares resistentes à antracnose requer, além do conhecimento das raças fisiológicas prevalentes na região onde se pretende utilizá-las, o conhecimento das características genéticas do fungo.

O estudo da variabilidade em fungos fitopatogênicos torna-se importante tanto para estudos genéticos como para facilitar a condução de trabalhos de melhoramento envolvidos com doenças por eles causadas. O conhecimento da variabilidade do patógeno é um requisito básico para o desenvolvimento de cultivares resistentes capazes de manter essa característica por períodos prolongados de tempo (Rava et al. 1993).

Azevedo (1976) salienta que, além da mutação, a heterocariose, a recombinação sexual, recombinação assexual ou parassexualidade e determinantes citoplasmáticos constituem fontes para a variabilidade e diversidade existentes entre os fungos. O estudo de qualquer destes

processos já estaria contribuindo para o melhor conhecimento do comportamento genético do fungo.

A forma meiospórica *Glomerella cingulata* (Stonem) Spauld. & Schrenk f. sp. *phaseoli*, é conhecida também como *Glomerella lindemuthianum* Shear (Sutton, 1992), sendo que alguns autores utilizam a denominação *Glomerella cingulata* como preferem outros autores (VonArx, 1981, citado por Sutton, 1992; Medeiros, 1988; Tu, 1992). Recentes evidências obtidas em laboratório demonstraram que é relativamente fácil encontrar a forma sexual de *C. lindemuthianum* (Mendes-Costa, 1996). Não existia nenhuma comprovação do estado meiospórico de *C. lindemuthianum* na literatura até 1970, quando Kimati e Galli (1970) obtiveram a formação de peritécios férteis através de cruzamentos em meio de cultura. Estas estruturas também foram encontradas por Batista e Chaves (1982), Bryson (1990, citado por Bryson et al. 1992) e Mendes-Costa (1996).

A ocorrência do ciclo parassexual também não foi definida. O principal requisito para a parassexualidade é a ocorrência de heterocariose. Bos (1985) realizou estudos com recombinação somática em mutantes auxotróficos de *C. lindemuthianum* e verificou a ocorrência de anastomoses entre isolados de raças diferentes. Encontrou também prováveis heterocários estabelecidos em meio mínimo e heterocários através de fusão de protoplastos. Os dados obtidos por Bos (1985) não chegam a demonstrar de forma conclusiva a existência da parassexualidade, mas sim dão fortes provas de que este fungo tem potencial para realizar algumas etapas.

Em outras espécies de *Colletotrichum* estudos realizados com auto-incompatibilidade vegetativa também apontam a possibilidade de heterocariose (Brooker, Leslie e Dickman, 1991). No entanto, há autores que discordam por não terem observado núcleos diplóides em grupos de

heterocários encontrados (Dutta e Garber, 1960), ou por não terem observado a ocorrência de hifas e/ou conídios binucleados (Medeiros, 1988).

Recentemente alguns indícios citológicos de heterocariose foram obtidos por Mendes-Costa, Davide e Roca (1995), que observaram a existência de conídios binucleados e a ocorrência de anastomose entre hifas de *C. lindemuthianum*. Em função destas dúvidas, verifica-se a necessidade de mais estudos a este nível.

Concomitantemente aos processos de variabilidade já conhecidos e citados, apareceram, a partir da década de 80, nomes técnicos e interpretações que tentam explicar mecanismos não-mendelianos de herança em fungos, como o polimorfismo cromossômico (Kistler e Miao, 1992). Através do emprego de eletroforese de campo pulsado, foi observada uma grande variação numérica em isolados de *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de *Stylosanthes* e de diversas regiões de origem. Esta variabilidade foi mais evidente em cromossomos com menos de 1,2 milhões de pares de base (Mb), chamados “mini-cromossomos” (Masel e Manners, 1990; Masel, Irwin e Manners, 1993a), os quais ainda não foram encontrados nos isolados estudados de *C. lindemuthianum*.

Através de eletroforese de campo pulsado é possível contar os cromossomos pela presença ou ausência de bandas e inferir o tamanho dos mesmos pelo seu peso. Porém, não se consegue visualizar os cromossomos. As diferenças na mobilidade das moléculas de DNA tornam esta metodologia em alguns casos duvidosa (Lai et al. 1989; Wickes, Golin e Known-Cgung, 1991).

Neste trabalho foram realizadas análises citológicas de *C. lindemuthianum* através de microscopia óptica e eletrônica com o objetivo de detectar mecanismos que possam explicar a alta variabilidade genética deste fungo.

1.2 REFERENCIAL TEÓRICO

Glomerella cingulata (Stonem.) Spauld. & Schrenck (Ascomycotina) f. sp. *phaseoli* é comumente encontrada na sua forma mitospórica ou conidial *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) (Deuteromycotina) causando as moléstias conhecidas como antracnose no feijoeiro (Sutton, 1992).

A classificação dos Ascomicetos baseia-se em sua forma de reprodução sexual (forma meiospórica = forma sexual = forma telomórfica). Sob esta forma o causador da antracnose do feijoeiro ainda não foi encontrado na natureza, sendo que o seu estado conidial foi descoberto primeiro (forma mitospórica = forma assexual = forma anamórfica), e o seu nome mais amplamente empregado e conhecido. Com base no amplo uso do nome das formas conidiais, é encontrado em inúmeras publicações com o nome *C. lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib., o qual será considerado como tal neste trabalho, nomenclatura hoje aceita e mundialmente empregada para a fase mitospórica do agente causal da antracnose do feijoeiro comum, pertencente à classe dos Coelomycetes e à ordem Melanconiales.

A taxonomia de *Colletotrichum* spp. ainda não está clara (Frost, 1964; Sutton, 1980 citado por Davis, Boland e Howiff, 1992; Gil et al. 1994, Sherriff et al. 1994; Samuels e Seifert, 1995; Bailey et al. 1996), sendo respeitada a nomenclatura utilizada pelas publicações, mas nos casos onde não se encontram publicações específicas com o nome de *C. lindemuthianum*, realizam-se comparações com as publicações que utilizam a nomenclatura de *C. gloeosporioides*, já que há autores que consideram *C. lindemuthianum* específico para o feijoeiro, mas dentro da espécie de *C. gloeosporioides* (Von Arx, 1981, citado por Sutton, 1992; Medeiros, 1988; Tu, 1992).

1.2.1 FORMA MEIOSPÓRICA

A fase sexual dos membros do gênero *Glomerella* foi inicialmente estudada por Edgerton (1912, 1914), constituindo-se na primeira descrição da diferenciação sexual em ascomicetos (Wheeler, 1954). Hüttig, 20 anos depois, publicou novamente resultados sobre estudos de sexualidade em *Glomerella* isolada de tomate (Hüttig, 1935). Uecker (1994) fez um trabalho descritivo em *Glomerella* isolado de morango. Recentemente, Mendes-Costa (1996) fez estudos com *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, mostrando a natureza homotática deste fungo, resultado contraditório ao de Kimati e Galli (1970) que realizaram estudos nesta mesma espécie, concluindo que o fungo é heterotático.

Wheeler (1954) divide o processo sexual em *G. cingulata* em 4 passos: iniciação do peritécio, plasmogamia, cariogamia e divisão meiótica e reducional. O processo é descrito por Wheeler et al. (1948) e McGahen e Wheeler (1951), iniciando-se por 2 células uninucleares que se desenvolvem com curtas ramificações nas proximidades dos septos das hifas. O crescimento lateral

externo das 2 hifas adjacentes começa formando duas células, cada uma chamada de hifa de copulação. A hifa de copulação externa produz a parede do peritécio e a interna produz o ascogônio. Antes de completar o desenvolvimento da parede peritecinal, o ascogônio funde-se com uma hifa de copulação; segue-se então a formação de hifas ascógenas, o desenvolvimento dos primórdios dos ascos, a cariogamia, a meiose, a mitose pós-meiótica e a formação dos ascósporos. Durante este processo, Lucas (1946) inicialmente verificou em *G. cingulata* o número haplóide de 4 cromossomos nos ascos jovens, antes da fusão e depois na divisão reducional. Este número foi confirmado posteriormente por Wheeler et al. (1948) em *G. cingulata* isolado de *Ipomea*.

Estudos a nível genético e citológico foram realizados em *G. cingulata* até a década de 50 (Edgerton, 1912, 1914; Chilton, Lucas e Edgerton, 1945; Lucas, 1946; Wheeler et al. 1948; Chilton e Wheeler, 1949a, 1949b; Wheeler, 1950, 1954, 1956; McGahen e Wheeler, 1951; Wheeler e McGahen, 1952; Wheeler e Driver, 1953). Após este período não se encontram relatos na literatura, até 1970, quando Kimati e Galli confirmaram a forma meiospórica para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*. A utilização da forma meiospórica para estudos genéticos tem sido pouco explorada (Batista e Chaves, 1982; Bryson et al. 1992; Mendes-Costa, 1996).

De acordo com Kimati e Galli (1970), que estudaram *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, esta produz peritécios mais ou menos arredondados de diâmetro variável. Os peritécios podem formar rostros sendo os menores em forma de papila e os maiores alongados. O canal do rostro é formado de paráfises hialinas e filiformes; à medida que o peritécio amadurece, tornam-se enegrecidas a partir do ápice. Os ascos são envolvidos por paráfises filiformes, delicadas e visíveis até mais ou menos 27 dias de idade, a partir de então mostrando-se evanescentes. Estes autores encontraram ascósporos de 2 tipos: alantóides e elipsoidais, o que coincide com relatos anteriores

feitos por Edgerton (1914) e Wheeler e Driver (1953) entre outros para *G. cingulata* isolada de *Ipomea*.

Kimati e Galli (1970) em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* encontraram ascósporos alantóides medindo em média 20 x 6,5 µm que são formados de 1 a 8 por asco. Também encontraram ascósporos elipsoidais em número de 8, medindo 10 x 4 µm. Wheeler e Driver (1953) encontraram uma média de 24,1 x 5,4 µm nos ascósporos elipsoidais de *G. cingulata* isolada de *Ipomea*.

Estudos citogenéticos em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* não têm sido realizados.

1.2.2. FORMA MITOSPÓRICA

C. lindemuthianum tem o micélio septado e ramificado, produzindo acérvulos (corpos de frutificação) onde são formados os conídios (Taber e Taber, 1974). Os conídios formam massas de cor salmão ou mel, são hialinos, unicelulares, oblongos e cilíndricos, apresentando as extremidades arredondadas e medem de 3,5 a 4,5 µm x 9,5 a 11,5 µm (Sutton, 1992).

Por ocasião da germinação, um conídio de *Colletotrichum* spp. pode emitir um ou mais (até quatro) tubos germinativos, sendo mais freqüentes dois, os quais podem formar apressórios em seus ápices, para a penetração no hospedeiro (Mould, Boland e Robb, 1991b; Manandhar, Hartman e Wang, 1995). Estes últimos autores descrevem que, em meio de cultura ao longo de 2 a 3 horas enquanto ocorre a emissão do tubo germinativo, o núcleo usualmente entra no processo de mitose e o núcleo filho dirige-se ao lado oposto do conídio. De forma mais comum, o tubo germinativo tem origem lateral, perto do extremo do conídio.

Justamente ou durante a emergência do tubo germinativo, um septo é desenvolvido perto da região mediana do conídio, dividindo-o em duas células uninucleadas. Estes autores através, da microscopia óptica, fizeram um estudo onde descreveram apressórios maduros multinucleados, indicando a ocorrência de divisões mitóticas durante a diferenciação do apressório (Mould, Boland e Robb, 1991b; Manandhar, Hartman e Wang, 1995).

1.2.3. FONTES DE VARIABILIDADE EM FUNGOS

Tanto a forma meiospórica como a mitospórica são altamente variáveis e são diferenciadas em numerosos tipos fisiológicos e genéticos (Sutton, 1992; Bryson et al. 1992). No agente causal da antracnose do feijoeiro ocorrem raças fisiológicas que afetam diferencialmente determinadas cultivares de um mesmo hospedeiro (Kimati e Galli, 1970; Batista e Chaves, 1982; Rava et al. 1993; Mahe, Grisvard e Dron, 1993; Rava, Purchio e Sartorato, 1994; Balardin, 1997).

Existem variações dentro de populações selvagens de fungos que não apresentam o ciclo sexual na natureza. Há também muitos relatos de variabilidade em isolados monospóricos, quando mantidos e cultivados em laboratório (Rodrigues, 1987; Brooker, Leslie e Dickman, 1991). Hastie (1981) conclui que a mutação é a fonte básica de variação genética, e a heterocariose e heteroplasmose conduzem à variação em fungos selvagens. A recombinação genética através do ciclo parassexual obviamente tem o valor potencial na biologia de fungos conidiais e outros fungos (Hastie, 1981). Kistler e Miao (1992) propõem que o polimorfismo cromossômico também deve ser considerado como fonte de variação.

Poucos trabalhos têm sido feitos sobre a citologia de *Colletotrichum* (Medeiros, 1988; Tebeest et al. 1989; Mendes-Costa, Davide e Roca, 1995) sendo, a maioria, relacionada com a identificação de isolados dentro de grupos de auto-incompatibilidade (Brooker, Leslie e Dickman, 1991) e penetração do fungo na folha (Mercer, Wood e Greenwood, 1975; O'Connell, Bailey e Richmond, 1985; Van-Dyke e Mims, 1991; Mould, Boland e Robb, 1991a, 1991b).

1.2.3.1. Troca de material genético

Vários tipos de conexões entre células podem permitir a troca de material, tanto como o núcleo inteiro como simplesmente de fragmentos. Estas conexões permitiriam também a troca de material genético extra-nuclear, como DNA mitocondrial ou plasmidial. Conexões entre células podem gerar heterocariose, como cita Griffiths (1995).

Em fungos filamentosos, são as anastomoses entre hifas que permitem a troca ou passagem do núcleo bem como parte do citoplasma. A anastomose pode ser de 2 tipos: em forma de H e adjacente. Anastomoses entre hifas foram encontradas por Bos (1985) e Mendes-Costa, Davide e Roca (1995) em *C. lindemuthianum*, porém, sem verificar a passagem de núcleo. Bos (1985) acompanhou o processo de formação de anastomoses detalhadamente e verificou que, nesta espécie, estas ocorrem de forma freqüente e não, como um evento ocasional.

Em microsporos que são pertencentes a organismos pluricelulares, existem conexões conhecidas como citomixia, onde também ocorre uma fusão das células, fusão dos núcleos, da membrana celular ou da parede em forma de pontes (Omara, 1976; Basavariah e Murthy, 1987; Oliveira, 1994), como ocorre nas anastomoses descritas em fungos.

Outro tipo de modificação celular foi descrito citologicamente com detalhes pela primeira vez por Rodentier e Hurd-Karber (1947) em uredosporos de ferrugens de cereais, e foi denominado “corpos de fusão”. Estes autores ressaltam a importância que estas fusões podem ter tido na história das ferrugens ou na origem de raças. Muito provavelmente devem ter sido produzidos tubos germinativos que formaram anastomoses com núcleos de diferentes raças, e que depois formaram o “corpo de fusão”, já que foi observada a movimentação de grânulos entre células, embora não tenha sido feito nenhum tratamento diferenciando o núcleo. Outros trabalhos foram publicados posteriormente (Manners e Bampton, 1957; Wilcoxson, Tuite e Tucker, 1958), dando ênfase à importância genética destas fusões. Wilcoxson, Tuite e Tucker (1958) observaram vários núcleos nos “corpos de fusão”, indicando que provavelmente ocorre a troca efetiva de material nuclear; também observaram 2 núcleos muito próximos numa mesma célula. Recentemente estas conexões foram descritas em conídios de isolados de *C. gloeosporioides* (Uecker, 1994) e *C. lindemuthianum* (Mendes-Costa, 1996).

1.2.3.2. Ciclo Parassexual

As primeiras observações referentes ao ciclo parassexual em fungos filamentosos foram feitas em 1952 por Pontecorvo e Roper. O ciclo parassexual leva à diploidização e à recombinação gênica, sem entretanto passar pelas etapas da reprodução sexual.

Em 1956 Pontecorvo descreveu os passos para o ciclo parassexual da seguinte forma:

a) fusão de 2 núcleos haplóides diferentes em um heterocário;

b) multiplicação do micélio diplóide heterozigoto resultante da fusão, juntamente com o núcleo haplóide;

- c) eventual crescimento do micélio diplóide que se estabelecerá como isolado;
- d) permuta mitótica que pode ocorrer durante a multiplicação do núcleo diplóide;
- e) haploidização vegetativa do núcleo diplóide.

A heterocariose é considerada o primeiro passo necessário para a confirmação do ciclo parassexual e, para isto, devem ocorrer anastomoses entre hifas, com posterior passagem de núcleo de uma célula para outra, encontrando-se dois núcleos diferentes. Hastie (1981) cita 2 tipos de heterocários em fungos. No primeiro tipo, cita como exemplo *Aspergillus nidulans* e *Neurospora crassa*: as células das hifas destes fungos são multinucleadas e os núcleos podem migrar de célula para célula, estendendo-se a heterocariose para as células apicais das hifas; desta forma os heterocários podem ser regularmente propagados utilizando-se as extremidades das hifas. O segundo tipo de heterocário é exemplificado com *Verticillium dahliae* onde há predominância de hifas com células uninucleadas e onde pode ocorrer uma restrita migração nuclear, sendo as extremidades das hifas homocarióticas.

O segundo passo para o ciclo parassexual é a ocorrência de fusão nuclear entre os núcleos somáticos no heterocário (Hastie, 1981). Fusões nucleares ocorrem ao acaso, porém, só fusões entre núcleos geneticamente diferentes são detectadas através de marcadores (Pontecorvo e Roper, 1954). A frequência de conídios diplóides heterozigotos em *Aspergillus* é geralmente de 1 em 10^6 (Pontecorvo, 1953).

Em *A. nidulans* provas da diploidia são obtidas rotineiramente com medidas de conídios, uma vez que conídios diplóides têm aproximadamente o dobro de tamanho dos conídios haplóides (Pontecorvo, 1953). O tamanho de conídios pode ser influenciado por mutações em genes simples, e no caso de diplóides instáveis, como os produzidos por *Verticillium albo-atrum* e

que têm rápidos segregantes haplóides, poderiam ser classificados erroneamente como haplóides, principalmente se são examinadas culturas velhas (Hastie, 1981).

Hastie (1981) cita outros critérios para identificar núcleos diplóides, como a quantificação de DNA e a contagem de cromossomos. Evidências citológicas tais como número, tamanho e estrutura dos cromossomos constituem o critério mais convincente da plôidia. Entretanto, estas evidências são difíceis de serem obtidas, pela dificuldade de realizar estudos citogenéticos em hifas. Este autor cita alguns trabalhos com fungos (*A. nidulans*, *Ustilago violacea* e *Cochliobolus sativus*) onde se conheciam suas formas haplóides e diplóides por evidências genéticas e em que se realizaram comparações citológicas, mas que em nenhum destes exemplos o resultado foi bem definido. Nos trabalhos realizados em *Aspergillus* onde quantificou-se DNA (Heagy e Roper, 1952) e se fez contagem de cromossomos (Robinow e Caten, 1969), conhecia-se a existência da condição diplóide.

O seguinte passo seria a haploidização vegetativa. Pontecorvo, Gloor e Forbes (1954) considerou como evidências genéticas, do processo de aneuploidização dos diplóides em *A. nidulans*, a presença das colônias recombinantes segregantes, reconhecidas através de linhagens mutantes para a cor dos conídios e de mutantes deficientes nutricionais. Com estes marcadores nutricionais e de cor, confirmou a formação dos diplóides e reconheceu a formação de vários e diferentes aneuplóides, que levariam à formação do haplóide. Atualmente aceita-se a hipótese de que este processo se dá por intermediários aneuplóides, isto é, ocorre uma série de aneuploidizações onde o diplóide heterozigoto vai perdendo cromossomos através de não-disjunções, presumivelmente ao acaso, até que o núcleo haplóide é formado (Azevedo, 1987; Kotlyarevskii e Levites, 1991; Bagagli, 1992).

A seqüência de eventos: fusão de núcleos diferentes, permuta mitótica (não necessariamente) e haploidização têm o mesmo efeito de um ciclo sexual regular e acrescentam um tipo de recombinação às espécies de fungos que apresentam este ciclo (Fincham, Day e Radford, 1979).

Em *C. lindemuthianum* o ciclo parassexual ainda não foi determinado, por falta de provas citológicas e genéticas. Bos (1985) realizou estudos com recombinação somática nesta espécie, encontrando evidências de heterocariose com mutantes auxotróficos e, através de fusão de protoplastos, também verificou microscopicamente a ocorrência de anastomoses. No seu trabalho, Bos (1985) encontrou prováveis diplóides que reconheceu através da seleção com meio mínimo. O autor não encontrou conídios híbridos, nem recombinantes; portanto não pode confirmar a cariogamia. Conídios binucleados e a ocorrência de anastomoses entre hifas foram encontrados por Mendes-Costa, Davide e Roca (1995) em *C. lindemuthianum*, podendo ser uma indicação de heterocariose. Dutta e Garber (1960), através da indução com luz ultravioleta, encontraram isolados mutantes deficientes em nutrição e cor, em 2 raças fisiológicas de *Colletotrichum lagenarium*. Obtiveram heterocários envolvendo deficientes nutricionais nas mesmas raças, porém, não encontraram nenhum diplóide em amostras contendo até 10^8 esporos. Medeiros (1988) descarta a possibilidade do ciclo parassexual por não ter encontrado núcleos pareados ou próximos em conídios de *Colletotrichum gloeoporioides*.

O ciclo parassexual é uma ferramenta importante no estudo da patogenicidade dos fungos imperfeitos, e deve dar-se ênfase ao esforço para tentar demonstrar-se o ciclo parassexual nas espécies de fungos (Dutta e Garber, 1960). O ciclo parassexual foi reconhecido em mais de 30 espécies de fungos (Azevedo, 1987).

1.2.3.3. Polimorfismo Cromossômico

Numa revisão feita por Kistler e Miao (1992), abrangendo trabalhos com eletroforese de campo pulsado, publicados nos 5 anos anteriores, concluem que o polimorfismo cromossômico é comum entre espécies de fungos.

Masel et al. (1990) encontraram através de eletroforese de campo pulsado em *C. gloeosporioides* isolados de *Stylosanthes* um grande polimorfismo cromossômico. Parte do polimorfismo existente em *C. gloeosporioides* pode ter surgido num processo de haploidização irregular o que originou aneuplóides, decorrente de um processo parassexual, como sugerido pelos autores. Liyanage, McMillan e Kistler (1992) também encontraram polimorfismo cromossômico em *C. gloeosporioides* isolados de *Citrus*.

Em *C. gloeosporioides* isolados de *Stylosanthes* na Austrália e em outros países, Masel, Irwin e Manners (1993a) mostraram uma considerável variação em mini-cromossomos quanto ao número e tamanho. Estes autores encontraram de 3 a 5 cromossomos de 2 a 6 Mb e entre 3 a 10 mini-cromossomos de 270 a 1.200 kb. Os autores, inclusive, dividiram os isolados em 2 grupos fundamentando-se no número de mini-cromossomos. Também verificaram, em 1 só isolado de *C. lindemuthianum* proveniente da Austrália, a ausência destes mini-cromossomos.

Giatgong e Frederiksen (1969) e Rustchenko-Bulgac, Sherman e Hiscks (1990) consideram que algumas aberrações cromossômicas podem estar correlacionadas com a variação patogênica nos fungos dentro de uma mesma espécie. Junto a estes autores, Kistler e Miao (1992) e Masel, Irwin e Manners (1993b) entre outros, ressaltam a importância do estudo dos cromossomos e seu polimorfismo, por poder estar relacionado diretamente à variabilidade de patógenos. He et al. (1995) verificaram quanto à variabilidade do número de cromossomos em *C.*

gloeosporioides isolados de *Stylosanthes* que não existe uma relação direta com as raças fisiológicas.

Lembrando que, *C. gloeosporioides* chama-se *G. cingulata*, quando encontrada a forma sexual ou meiospórica (Sutton, 1992). Verifica-se no primeiro trabalho de citogenética realizado em *G. cingulata* por Lucas (1946) que este autor descreve a presença de 4 cromossomos de forma constante, os quais foram observados através de microscopia óptica. Lucas (1946) descreve que encontrou os cromossomos com o maior comprimento na prófase I: o maior dos cromossomos com aproximadamente 4 μm de comprimento e o menor com aproximadamente 1 μm de comprimento e na metáfase os cromossomos não foram maiores do que 0,6 μm . O trabalho feito originalmente por Lucas (1946) foi confirmado posteriormente por Wheeler et al. (1948) em *G. cingulata* isolados de *Ipomea*. Em *C. lindemuthianum* não se encontraram trabalhos descrevendo o número de cromossomos, embora pelos conhecimentos gerais de biologia e genética possa ser esperado que o número haplóide de cromossomos seja o mesmo ou parecido com a sua fase meiospórica, *G. cingulata* ($x = 4$), mesmo sendo este f. sp. *phaseoli*.

Os primeiros resultados obtidos para a forma meiospórica e aqueles obtidos posteriormente para a forma mitospórica de *Colletotrichum*, onde foi encontrada uma alta variabilidade no cariótipo eletroforético, indicam que mais estudos são necessários. No entanto, pode-se esperar que isolados de uma mesma região geográfica e com o mesmo hospedeiro, tenham o mesmo número de cromossomos.

Os processos que geram o polimorfismo cromossômico são as alterações estruturais e numéricas, que ocorrem durante as divisões celulares (Mills e McCluskey, 1990; Kistler e Miao,

1992; Masel, Irwin e Manners, 1993b). Através da eletroforese de campo pulsado é possível contar os cromossomos pela presença ou ausência de bandas e inferir o tamanho dos mesmos pelo seu peso. Porém, não se consegue visualizar os cromossomos. As diferenças na mobilidade das moléculas de DNA tornam esta metodologia em alguns casos questionável (Lai et al. 1989; McDonald e Martinez, 1991; Talbot, Oliver e Coddington, 1991; Wickes et al. 1991). Rodriguez e Redman (1992) consideram que embora a extensa análise eletroforética realizada por Masel e Manners (1990), esta ainda não está completa, e não é possível definir o número de cromossomos ou o tamanho do genoma em nenhuma espécie de *Colletotrichum*.

1.2.4 ULTRAESTRUTURA DO NÚCLEO

Sharma e Sharma (1994) consideram que o emprego do microscópio eletrônico em estudos citogenéticos pode ajudar a clarificar a estrutura dos cromossomos ao nível submicroscópico, podendo fornecer detalhes minúsculos de cromossomos e outros componentes celulares pelos altos aumentos obtidos. Essas informações podem ser úteis para a compreensão da genética deste fungo, bem como para um melhor conhecimento de sua morfologia.

Nas hifas em crescimento, os núcleos estão subapicalmente à região onde primeiro se encontram as mitocôndrias (Isaac, 1996). O núcleo de fungos é geralmente pequeno e difícil de detectar, mantendo-se numa posição central na hifa, ou em outras posições conseguidas através de migrações na rede de hifas (Isaac, 1996).

Nos fungos, o núcleo está limitado por uma dupla membrana ou envelope nuclear, que é perfurado com poros. O espaço do poro nuclear comumente contém um diafragma composto por material protéico (Ghosh, 1973).

Ghosh (1973) cita que durante a divisão celular a membrana nuclear pode-se manter completamente dispersa, formando grampos ou permanecer intata (Zickler, 1970; Wells, 1970; Ghosh, 1973). Durante a intérfase da primeira prófase da meiose, o nucléolo apresenta-se em íntimo contato com o envoltório nuclear. Nos meiócitos de algumas plantas e em fungos como *Haplopappus* e *Neottiella*, durante a prófase I o nucléolo aplanar-se e adota um formato alantóide (Brown e Bertke, 1979). Na microscopia eletrônica o nucléolo é normalmente visível nos fungos em cortes ultrafinos (Isaac, 1996).

O número de cromossomos em fungos filamentosos pode variar de 3 a 21 (Mills e McCluskey, 1990). Os cromossomos de fungos variam entre 0,2 e 10 Mb podem gerar cariótipos moleculares (Kistler e Miao, 1992), e também podem ser vistos através de microscopia eletrônica como apontam Fincham, Day e Radford (1979). De uma forma indireta tem-se obtido o número de cromossomos em espécies com poucos e pequenos cromossomos, através de reconstruções de cortes consecutivos do núcleo, porque cada homólogo no pareamento da meiose está relacionado a um complexo sinaptonêmico (Moens e Perkins, 1969; Byers e Goetsch, 1975).

CAPÍTULO 2

CITOGENÉTICA DE *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck. f. sp. *phaseoli*

2.1 INTRODUÇÃO

O conhecimento do comportamento e características citogenéticas de uma espécie são importantes para descrevê-la, e com estes conhecimentos básicos, podemos entender melhor outras características a nível genético e as fontes de variabilidade que possam estar ocorrendo. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck (Ascomycotina) f. sp. *phaseoli* é comumente encontrada em sua forma mitospórica ou conidial *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Scribner (Deuteromycotina) causando as moléstias conhecidas como antracnose no feijoeiro (Sutton, 1992). São encontrados alguns estudos de citogenética para *G. cingulata* (Lucas, 1946; Wheeler et al. 1948), descritivos a nível morfo-genético (Hüttig, 1935; McGahen e Wheeler, 1951) e morfológico (Uecker, 1994).

No processo sexual de formação de esporos, o número esperado é de 8 ascósporos/asco, no entanto, são encontrados 4 ascósporos/asco quando são alantóides (Kimati e Galli, 1970); 1, 2 ou 4 no mutante “Dwarf” (Wheeler e Driver, 1953) e 0 a 4 em cruzamentos entre isolados de hospedeiros diferentes (Cisar et al. 1994), mostrando baixa fertilidade nos casos citados.

Este estudo teve como objetivos acompanhar e caracterizar a meiose e formação de ascósporos em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 ISOLADOS

Foram utilizados 3 isolados diferentes de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* provenientes da micoteca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA), apresentados na Tabela 1. Os isolados foram repicados em placas com M₃ (Junqueira et al. 1984). A meiose foi acompanhada nos isolados 531 e 1013.

TABELA 1. Isolados de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* utilizados. UFLA, Lavras, 1997.

ISOLADOS	1010	531 (re-isolado)	1013
RAÇAS	81	73	01
ORIGENS	Lambari - MG	EMBRAPA-CNPAF	Patos - MG

2.2.2 PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS

Com exceção da mistura de corantes carmim-orceína que corou melhor os cromossomos da maioria dos isolados, a coloração foi feita segundo Robinow (1975), com modificações que dependeram do isolado e da condição em que se encontrava o núcleo (Tabela 2).

2.2.2.1 Avaliações citológicas

Os peritécios foram retirados com 7 a 15 dias após a sua formação e esmagados intensamente para separação de ascos e ascósporos. Os ascósporos foram medidos com auxílio de uma ocular OSM adaptada ao microscópio óptico na objetiva de 40x, também foi contado o número de núcleos. Para isto foram medidos 30 ascósporos escolhidos aleatoriamente de 3 lâminas diferentes.

Para o estudo da meiose foram observados ascos em todos os estágios, em materiais provenientes de placas diferentes e de peritécios diferentes, escolhidos aleatoriamente. O número de cromossomos foi contado em 35 núcleos.

2.2.2.2 Fotomicrografias

Foram feitas fotomicrografias em filme branco e preto para papel, asa 25 e 100. Os filmes foram revelados com D-72 (Dektol) e Microdol respectivamente, as fotos foram reveladas em Kodalight ou Dektol em papel F3.

TABELA 2 Tratamentos aplicados para coloração de núcleos e cromossomos em ascos e ascósporos nos diferentes isolados avaliados. UFLA, Lavras, 1997.

Isolado	Fixação (horas)	Hidrólise HCl 60°C 10 min.	Corante (horas)	Montagem de lâminas	Núcleo
1010	Carnoy ac. 4-24 h	1N	Feulgen 8 h	Permanente	Interfásico
531	Carnoy prop. 24 h		C-O prop. 24 h	Semi-permanente e secagem ao ar*	Divisão
	Carnoy acet. 4-24 h	HCl 4N	Feulgen 12 h	Permanente	Interfásico
1013	Carnoy prop. 24 h	-	C-O prop. 12-22 h	Semi-permanente	Divisão
	Carnoy acet. 4-24 h	HCl 4N	Feulgen 24 h	Secagem ao ar	Divisão
	Carnoy acet. 24 h	HCl 4 N 5 min	Giemsa 24 h	Semi-permanente e permanente	Interfásico
	Carnoy acet. 24 h	HCl 4N 60°C	C-O acet. 24 h	Secagem ao ar*	Divisão

Carnoy ac.: 3 partes de álcool etílico absoluto e 1 parte de ácido acético glacial;

Carnoy prop.: 3 partes de álcool etílico absoluto para 1 parte de ácido propiônico;

Feulgen: Reativo de Shiff, modificado por Coleman (1938, citado por Robinow, 1975);

C-O prop.: Carmin-orceína propiônica 2 %;

C-O acet.: Carmin-orceína acética 2%;

Giemsa: Corante Giemsa 2% em tampão fosfato pH 6,8

* Segundo Carvalho (1995) e posteriormente lavadas rapidamente em cloroformio e no fixador, para serem fotografadas.

2.2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A avaliação do comprimento e largura dos ascósporos e número de cromossomos dos ascos foi realizada em delineamento inteiramente casualizado com 30 e 35 repetições,

respectivamente. Foi realizada uma análise de variância (Tabela 3) conforme o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : observação referente à repetição j do isolado i ;

μ : efeito de uma constante comum a todas as observações;

t_i : efeito aleatório do isolado i , $t_i \sim N(0, \sigma_g^2)$;

e_{ij} : efeito aleatório do resíduo associado à repetição j do isolado i , $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$;

TABELA 3 Esquema da análise de variância entre e dentro de isolados, com os graus de liberdade e esperanças dos quadrados médios¹. UFLA, Lavras, 1997.

Causas de Variação	GL	E (QM)
Isolados (entre)	t	$\sigma_c^2 + r\sigma_g^2$
Dentro	t(n-1)	σ^2
Total	tn-1	

1. t: número de isolados; r: número de repetições.

Os componentes de variância foram estimados pelo método dos momentos, e a variação fenotípica entre médias de isolados foi estimada conforme:

$$\hat{\sigma}_f^2 = \hat{\sigma}_g^2 + \frac{\sigma^2}{r}$$

na qual $\hat{\sigma}_f^2$ (variância fenotípica) e $\hat{\sigma}_g^2$ (variância genética) são as estimativas dos componentes apresentados na Tabela 3.

Realizaram-se testes de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos resíduos, e quando necessário, transformações do tipo \sqrt{v} foram feitas segundo Steel e Torrie (1980).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 FORMAÇÃO DOS ASCOS

A formação dos ascos começa com a formação dos ganchos (Figura 1a) seguida da meiose e de uma mitose.

Foram observadas células enveladas com uma célula central maior onde se encontrava cromatina um pouco condensada em um núcleo maior (aproximadamente 2,40 μm), que corresponde a mais do que o dobro do diâmetro do núcleo das células das hifas que se encontravam no contorno (aproximadamente 0,74 μm) como observado na Figura 1a (seta). Algumas vezes foi encontrada a célula central binucleada, cada núcleo com tamanho máximo de 1 μm . O núcleo foi encontrado sempre com material cromatínico corado.

O asco, assim que começa a formar-se, alonga-se muitas vezes, alcançando um tamanho que é mantido até completar a meiose, mas que pode variar de asco para asco.

2.3.2 DIVISÃO CELULAR NO ASCO

2.3.2.1 Meiose

Quando a cromatina começa a condensar-se e a ordenar-se na prófase I, encontra-se em uma área arredondada mais clara em comparação ao resto do citoplasma. Nesta fase, o núcleo

alcança o máximo do seu tamanho, aproximadamente de 5,17 μm (Figura 1b). Nesta fase, os cromossomos encontram-se mais distendidos e, portanto, ocupando maior espaço dentro do asco. O nucléolo está sempre presente e associado ao seu cromossomo organizador.

No diplóteno são evidenciadas regiões de coloração mais escura nos cromossomos, que poderiam ser consideradas pontos de quiasmas. Nesta fase foram contados 4 bivalentes (Figura 1b). Não foram encontradas imagens suficientes nesta fase. Na Figura 1c observa-se uma diacinese-metáfase I com 4-5 cromossomos e o nucléolo. O nucléolo permanece associado ao seu cromossomo organizador até a metáfase I, apresentando-se como um corpo em degeneração.

Também foram vistos, nos ascos em formação, núcleos com 4 e 8 cromossomos.

Poucas metáfases, anáfases e telófases foram encontradas na meiose I. Na metáfase foi possível contar, na maioria das células encontradas, 4 cromossomos. No isolado 531 foram observados 2 núcleos restaurados após a primeira divisão da meiose, enquanto no isolado 1013 parece não ocorrer intercinese, sendo muito rápida a passagem da última fase vista da meiose I à primeira fase vista da meiose II.

No isolado 531, foi mais fácil distinguir os 4 cromossomos. O maior dos cromossomos apresentou em média 1,10 μm e a região organizadora do nucléolo (RON). O segundo cromossomo apresentou um comprimento intermediário entre o maior e os menores cromossomos. Os dois menores cromossomos apresentaram aproximadamente 0,5 μm de comprimento, sendo que normalmente estão próximos.

Na prófase II, muitas vezes os núcleos foram observados próximos, cada um numa área clara menor do que a encontrada na prófase I. O nucléolo pode reaparecer na profase II, como observado num dos núcleos da Figura 1d. Em muitos casos foram observados 3 núcleos na

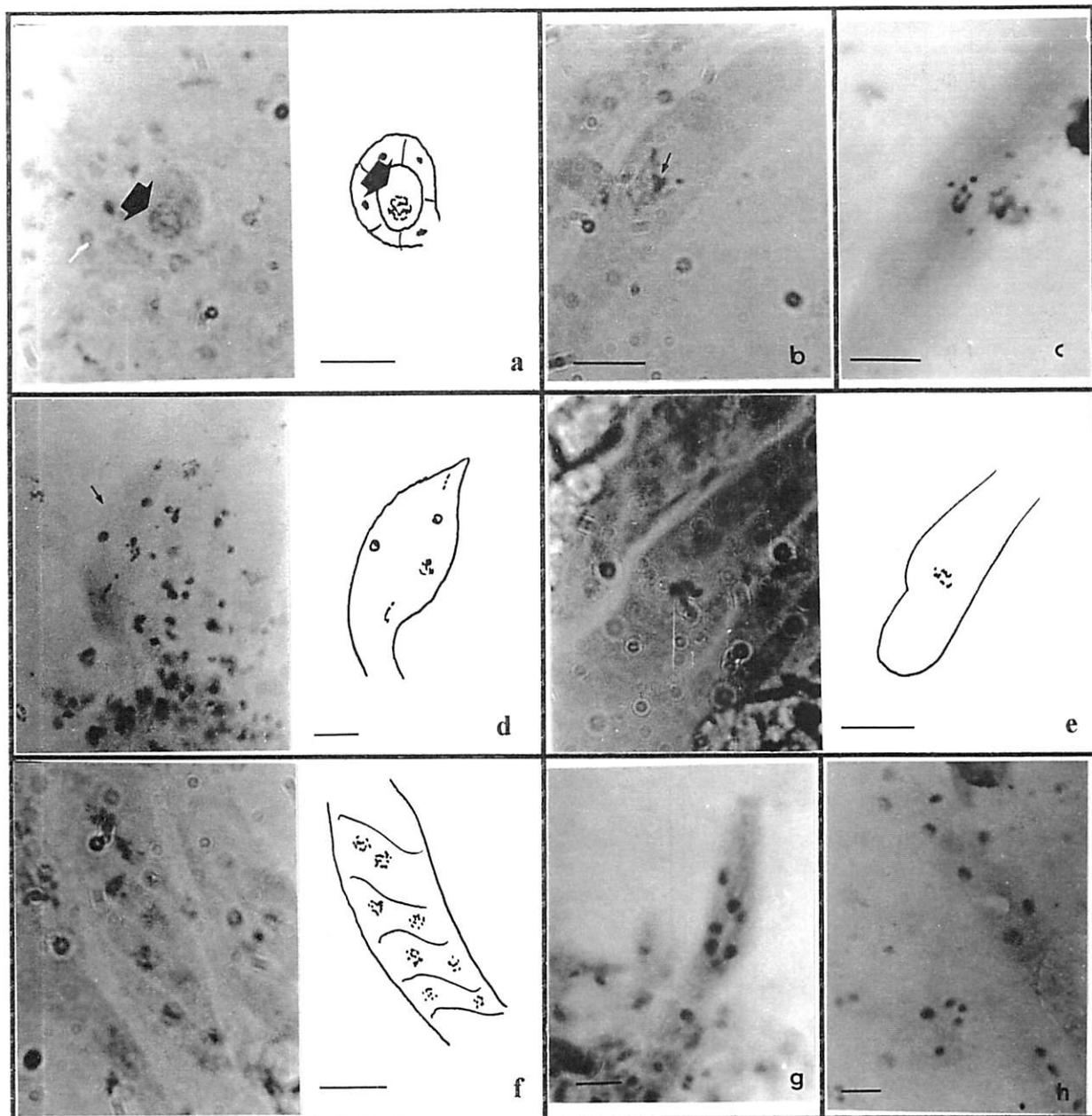


FIGURA 1 **a** - Isolado 1013, células enveladas e núcleo depois da fusão (seta); **b** - paquíteno do isolado 1013 mostrando nucléolo (seta); **c** - asco do isolado 1013 com 4 ou 5 cromossomos; **d** - asco (seta) do isolado 531 mostrando 1 núcleo em prófase II, 2 núcleos em metáfase II e 2 núcleos em interfase da mitose; **e** - asco do isolado 531 com 5 cromossomos, **f** - telófase mitótica do isolado 1013; **g** - núcleos desordenados no asco do isolado 531; **h** - núcleos ordenados no asco do isolado 531. UFLA, Lavras, 1997. — 5 μ m

metáfase e um na anáfase, evidenciando o assincronismo da segunda divisão. Outras configurações foram encontradas, em que alguns núcleos finalizaram a meiose (Figura 1d, seta). Nas células assincrônicas do isolado 531 foram encontrados cromossomos atrasados.

Em algumas metáfases, para ambos isolados, imagens apareciam com 5 ou 6 cromossomos (Figura 1e).

No final da meiose, na maioria dos ascos, foi possível ver 1 ou 2 núcleos com nitidez, sendo que os demais apresentaram-se fora de foco.

No isolado 1013 não se encontraram núcleos reconstituídos na telófase II.

2.3.2.2 Mitose

A mitose ocorre imediatamente após a meiose nos ascos, para a formação dos 8 ascósporos e ocorre de forma rápida. Foi possível identificar núcleos interfásicos com nucléolo nos ascos onde estava ocorrendo divisão de forma assincrônica (Figura 1d), no isolado 531.

Metáfases e anáfases foram encontradas, mostrando imagens com 4 grupos de material condensado, considerados como cromossomos. No entanto, os núcleos são pequenos (aproximadamente 1,3 μm) sendo difícil a diferenciação entre metáfases e anáfases.

No isolado 1013 depois da telófase da mitose, os núcleos mantêm-se ainda com cromossomos condensados (Figura 1f). Em seguida o nucléolo reaparece e começa a desespiralização dos cromossomos. Ao contrário, no isolado 531 foram encontrados núcleos reconstituídos antes da formação dos ascósporos (Figuras 1g e 1h).

Foi feita observação em 35 núcleos nítidos por isolado em todo o processo de formação dos ascos, resultando a média e a moda de 4 cromossomos. A contagem do número de cromossomos nos ascos foi dificultada pela profundidade de campo, encontrando-se valores para

o número de cromossomos que foram múltiplos de 4, como 8 e 12 cromossomos, mas não se mostrando nítido a quais núcleos pertenciam. O resultado da análise estatística mostra que os isolados são iguais quanto ao número de cromossomos (Anexo A, Tabela A1).

2.3.3 FORMAÇÃO DOS ASCÓSPOROS

2.3.3.1 Isolado 1013

A diferença mais notória entre os dois isolados é o arranjo dos núcleos para a formação dos ascósporos. No isolado 1013 pode-se generalizar que ocorre a migração dos núcleos na primeira fase da meiose de forma transversal ou longitudinal ao maior eixo do asco. Enquanto que na segunda fase da meiose esta migração é longitudinal e/ou oblíqua, sendo que os núcleos começam a se acomodar ao longo do eixo mais longo do asco. Na mitose, a segregação ocorre com maior frequência de forma transversal ao eixo mais longo, depois da telófase começa a ocorrer uma migração oblíqua (Figura 1f) e o núcleo termina de reconstituir-se quando praticamente ocorre a citocinese final. Como resultado, encontram-se os 8 ascósporos de uma forma quase ordenada, podendo-se ter idéia de quais são os núcleos irmãos. Na maioria das vezes foram encontrados 8 ascósporos/asco, porém, neste isolado, também foram encontrados ascos com 4 e 6 ascósporos.

2.3.3.2 Isolado 531

No isolado 531 os núcleos foram encontrados reconstituídos depois da mitose antes de ocorrer a formação dos ascósporos. Sendo que os mais diversos arranjos foram observados (Figura 1g). Evidenciando uma migração mais desordenada e mantendo (Figura 1h) ou não um alinhamento ordenado. Aos 7 dias os peritécios contêm os ascósporos formados (Figura 2a),

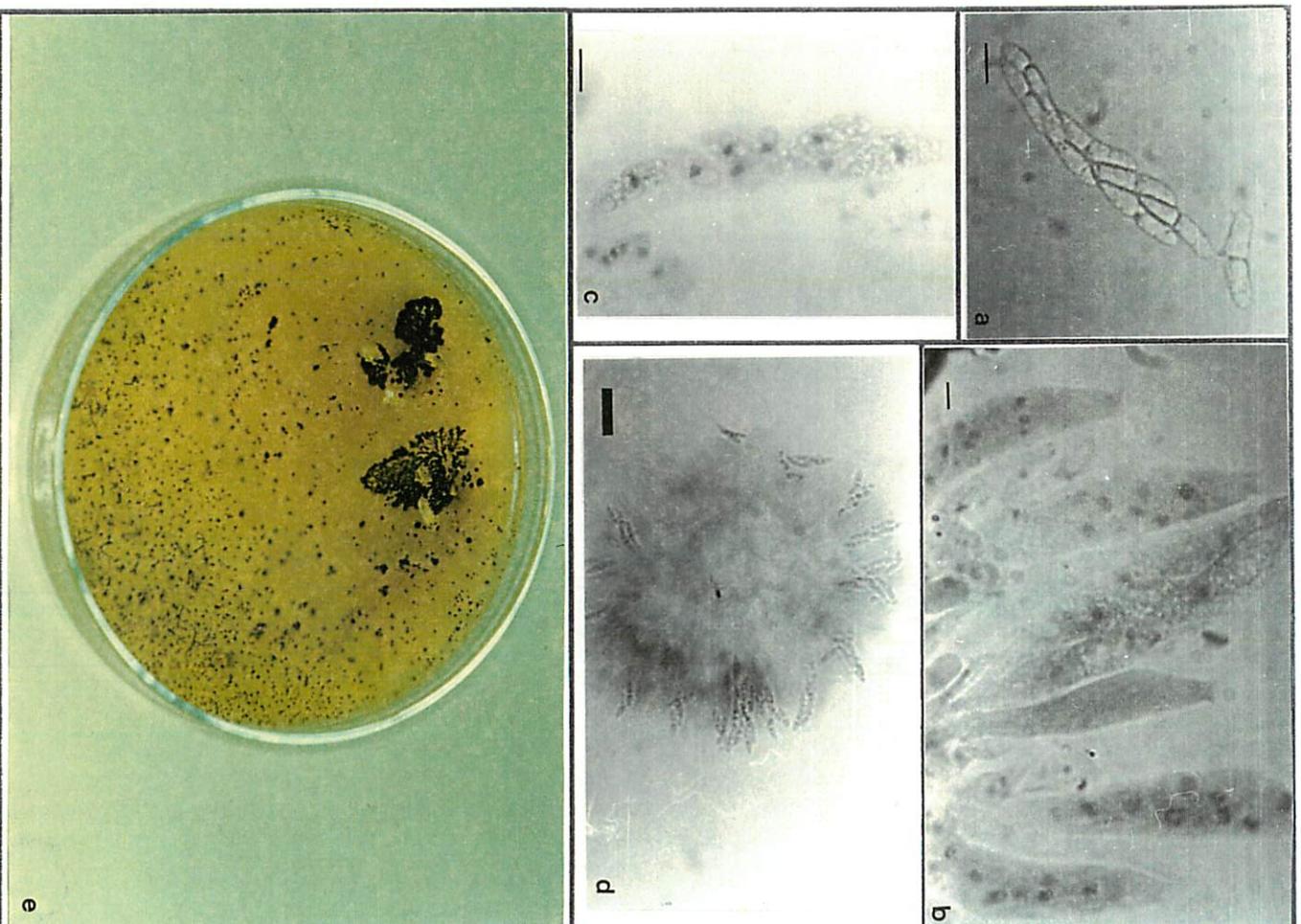


FIGURA 2 a - Liberação de ascósporos no isolado 531; b - ascos no peritécio do isolado 531; c - isolado 531 com ascósporos em vários graus de maturação; d - peritécio maduro do isolado 1013; e - placa (9 cm de diâmetro) com meio de cultura formando peritécios, isolado 531. UFPA, Lavras, 1997.

—, 5 μm; —, 25 μm

porém, ainda se observam ascos com diferentes tamanhos dentro do peritécio (Figura 2b). A liberação dos ascósporos se dá concomitante à desintegração da parede do asco.

Foram encontrados sempre 8 ascósporos/asco, porém, eles podem estar em diferentes graus de amadurecimento (Figura 2c), que foi determinado pelas diferenças dos tamanhos dos ascósporos, sendo encontrados ascósporos onde apenas havia ocorrido a citocinese e ascósporos já maduros, ocupando grande parte do espaço do mesmo asco. Não foram encontrados ascos com ascósporos de tamanhos discrepantes para serem liberados, descartando a possibilidade da formação de ascósporos anões ou gigantes.

2.3.4 CARACTERÍSTICAS DOS ASCÓSPOROS

Estes isolados produzem uma grande quantidade de células enoveladas, ascos novos e ascos maduros por peritécio (Figura 2d). Foram encontrados ascósporos alantóides e elipsoidais nos isolados 531, 1013 e 1010 todos sem septos e uninucleados. Em determinados momentos pode ser observado o núcleo sem necessidade de coloração. Houve diferenças significativas quanto ao comprimento e largura dos ascósporos entre os 3 isolados avaliados (Tabela 4). As

TABELA 4 Resumo da ANAVA para comprimento e largura dos ascósporos dos isolados 1010, 1013 e 531, em meio de cultura. UFLA, Lavras, 1997.

Fontes de variação	comprimento		largura	
	GL	QM	GL	QM
Isolados	2	70,680**	2	42,376**
Dentro	87	3,168	87	0,991
Erro	89		89	

** significativo a 1%

médias e os parâmetros estimados são apresentados na Tabela 5 e 6.

TABELA 5 Médias do comprimento e largura em micrômetros (μm) de ascósporos com menos de 17 dias em meio M_3 . UFLA, Lavras, 1997.

Isolados	Comprimento	Largura
1010	19,624	5,344
531	21,320	7,168
1013	18,256	4,936
número de observações	90	90

Nos 3 isolados os dois tipos de ascósporos são formados em peritécios de 2 tipos: os que crescem isolados e grandes e os que são pequenos e crescem formando massas negras (Figura 2e).

TABELA 6 Estimativas dos parâmetros para a amostragem dos ascósporos. UFLA, Lavras, 1997.

	m	CV	σ_g^2	σ_r^2	h^2
Comprimento	19,733	9,02%	2,25	2,35	95,75%
Largura	5,816	17,12%	1,38	1,41	97,87%

2.4 DISCUSSÃO

O fato da relação núcleo/citoplasma ter sido muito grande resultou na ocorrência de profundidade de campo, o que dificultou a observação dos cromossomos ao microscópio óptico. Além disso, os cromossomos são muito pequenos. Em função disso, foram realizados estudos em

microscopia eletrônica, através de metodologias normalmente utilizadas para outros fungos. No entanto, até o momento, não foram encontradas seções que permitissem a visualização dos cromossomos e obteve-se pouco contraste para o núcleo. É provável que esta dificuldade deva-se ao fato de que o peritécio é um corpo altamente rígido. Isto pode ser constatado quando se compara o tipo de hidrólise que foi utilizada para a microscopia óptica. Enquanto que HCl 1N é suficiente para a maioria das células, para os peritécios em alguns casos (Tabela 2), foi necessário HCl 4 N a 60 °C. Os dados obtidos através de microscopia eletrônica, no entanto, permitiram realizar descrições morfológicas e de ultraestrutura, resultados que serão apresentados em trabalhos posteriores.

2.4.1 FORMAÇÃO DOS ASCOS

Neste estudo foi encontrada uma célula central fortemente corada, na maioria das vezes com um núcleo bem grande indicando que já ocorreu fusão. Com menos frequência esta célula foi encontrada binucleada, o que mostra que depois da migração dos núcleos ocorre a fusão rapidamente. Esses resultados são similares àqueles obtidos por Lucas (1946) e Wheeler et al. (1948) em *Glomerella cingulata* isolado de *Ipomea* que mostraram que os ascos originam-se dos ganchos de uma célula original binucleada e intensamente corada, nas células enoveladas, no peritécio novo. McGahen e Wheeler (1951) demonstraram posteriormente que estas células centrais enoveladas são as células de copulação ascogônicas, e que em um único peritécio, aparentemente, uma célula original binucleada dá origem ao gancho e ao asco. A fusão nuclear ocorre no asco novo, seguido de três divisões, as duas primeiras que correspondem à meiose e a terceira, à mitose.

2.4.2 DIVISÃO CELULAR NO ASCO

Lucas (1946) e Wheeler et al. (1948) descreveram, para *G. cingulata* isolado de *Ipomea*, uma meiose normal e número constante com 4 bivalentes no paquíteno. Neste trabalho, foram observados também 4 bivalentes no paquíteno para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

Foi difícil seguir o pareamento exato no paquíteno, algumas vezes pareciam ocorrer cromossomos não pareados. Alguns autores (Hrushovetz, 1956; Knox-Davies e Dickson, 1960) relacionaram os problemas de pareamento no paquíteno com a ocorrência de aneuplóides, estes problemas seriam ocasionados pela presença de cromossomos não homólogos. Na Figura 1c, assumindo-se que o cromossomo é maior nesta fase (aproximadamente 4 μm) e que está ligado ao nucléolo, tendo um segmento que sobressai, podem ser considerados 4 cromossomos. O número haplóide pode parecer 5 cromossomos, considerando o pedaço do cromossomo maior como um fragmento supranumerário não pareado.

Na meiose de *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* encontrou-se que o nucléolo vai diminuindo de tamanho e está ainda presente na metáfase, como relatado por Wheeler et al. (1948) em *G. cingulata* isolado de *Ipomea*.

Na mitose as fases ocorrem de forma rápida, o tamanho menor dos cromossomos deve-se ao fato de não formarem bivalentes, quando comparados aos da meiose. Estas observações coincidem com as realizadas por Lucas (1946) e Wheeler et al. (1948). No entanto, estes autores observaram o reaparecimento do nucléolo só no final da mitose, o que diferiu das observações encontradas no presente experimento. No entanto, em outros fungos, como

Neurospora (Fincham, Day e Redford, 1979) parece ocorrer de forma similar ao encontrado neste trabalho.

Na telófase foram observados 4 cromossomos coincidindo com os relatos de Lucas (1946) em *G. cingulata*.

A divisão assincrônica observada pode levar a falhas na divisão. Isto foi constatado pela observação de cromossomos atrasados e variação no número de cromossomos. Wheeler et al. (1948) encontraram em *G. cingulata* cromossomos atrasados nas 2 anáfases da meiose, porém, não encontraram variação no número de cromossomos. Essas alterações, que normalmente levam à diminuição da fertilidade, provavelmente foram as responsáveis pela produção de ascos vazios ou com poucos ascósporos (4 ou 6), como observados neste estudo. Observações de ascos com 4 ascósporos também foram feitas por Wheeler e Driver (1953), que relataram a desintegração cromossômica e nuclear (principalmente antes da mitose) em um mutante de *G. cingulata*. Os autores relacionaram este fenômeno com um tipo de controle genético, porém, sem muitas explicações de que forma este seria. Wheeler et al. (1948) também encontraram ascos com 1, 2 e 4 ascósporos em *G. cingulata*. Em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* Kimati e Galli (1970) encontraram de 1 a 8 ascósporos alantóides por asco.

Em *Trichometasphaeria turcica*, Knox-Davies e Dickson (1960) relacionam a ocorrência de menos de 8 ascósporos em um asco, com a degeneração de núcleos, no entanto eles não descrevem de que forma esta degeneração possa estar ocorrendo, mas sugerem que a perda de cromossomos como resultado do atraso possa conduzir a núcleos nulissômicos, com baixo vigor e degenerados. Em cruzamentos entre isolados de hospedeiros diferentes de *G. cingulata*, também foram encontrados 4 ascósporos/asco. Os autores fizeram um acompanhamento nos

descendentes, utilizando RFLP, encontrando resultados diferentes dos esperados, os quais seriam explicados, provavelmente, por recombinação intracromossômica ou por seqüências repetitivas de elementos transponíveis (Cisar et al. 1994), mostrando problemas de homologies entre cromossomos. Homologia entre cromossomos é um requisito imprescindível para uma segregação normal na meiose (Klein, 1994). Falhas na meiose indicam que poderiam ocorrer falhas na mitose, como não disjunção cromossômica, o que contribuiria com o polimorfismo cromossômico na fase vegetativa de fungos que apresentam o ciclo sexual na natureza.

O isolado 1013 passa rapidamente da primeira divisão meiótica para a segunda divisão e, igualmente, para a mitose. Esta divisão rápida deve dificultar a migração dos núcleos fazendo com que se mantenham mais ordenados. Esta divisão mais rápida deve ter contribuído para o fato de ter-se encontrado menos imagens favoráveis à observação dos cromossomos, quando comparado ao isolado 531.

No isolado 531 a presença de núcleos reconstituídos após a meiose e mitose indica que estas ocorrem de forma mais lenta, quando comparada ao isolado 1013. Este fato poderia levar a uma distribuição dos núcleos ao longo do asco. Além do assincronismo observado nas divisões deste isolado, verifica-se assincronismo na maturação dos ascósporos. Isto pode estar ocorrendo devido a um controle genético unido à distribuição irregular do citoplasma no asco para os ascósporos.

2.4.3 FORMAÇÃO E CARACTERÍSTICAS DOS ASCÓSPOROS

Lucas (1946) e Wheeler et al. (1948), trabalhando em *G. cingulata* isolado de *Ipomea*, encontraram 8 ascósporos/asco, cada um com um núcleo haplóide de 4 cromossomos. Não

descreveram diferenças quanto à morfologia dos cromossomos, provavelmente alguma aberração estrutural não teria sido detectada com a metodologia por eles empregada, devido ao tamanho tão pequeno dos cromossomos. Neste estudo, cromossomos pequenos poderiam ter sido confundidos com fragmentos, o que não exclui a possibilidade de pedaços extracromossômicos irem para os ascósporos. Miao, Covert e VanEtten (1991) mostraram que pedaços pequenos de cromossomos podem ser deletados e translocados, como resultado da meiose, no ascomiceto *Nectria haematococca*, o que estes autores definiram como cromossomos B.

Os isolados 1010, 1013 e 531 formam peritécios de forma espontânea nas condições de laboratório utilizadas, sem necessidade de indução, sendo diferentes, do que geralmente se conhece para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*.

Na sua forma mitospórica, os isolados são classificados em raças fisiológicas diferentes. Neste trabalho foram observadas diferenças no comprimento e largura dos ascósporos e durante o processo da formação dos ascos; quanto ao tempo de divisão, sendo mais rápida no isolado 1013, e quanto à ordenação dos ascósporos no asco. Nos estudos feitos anteriormente em *G. cingulata*, normalmente os 8 ascósporos estão sempre alinhados em duas fileiras desiguais no asco (Lucas, 1946; Wheeler et al. 1948), coincidindo com o arranjo encontrado de forma mais freqüente no isolado 1013. No entanto, no isolado 531 muitas vezes os 8 ascósporos foram encontrados arranjados de forma muito desordenada no asco.

Relacionado à ocorrência de 6 a 4 ascósporos/asco, como resultado da produção de ascósporos, não se detectou algum outro fator, além dos discutidos, que pudesse afetar diretamente a formação final dos ascósporos. Não ter encontrado desintegração cromossômica como observada por Wheeler e Driver (1953) ou desintegração nuclear (Wheeler e Driver, 1953;

Knox-Davies, 1960), mesmo depois da divisão ter ocorrido, relacionam-se provavelmente com a pouca resolução e nitidez das imagens encontradas e não, com a ausência das desintegrações em si.

Espera-se que alguns ascósporos nos isolados avaliados sejam aneuplóides, devido às falhas encontradas na meiose. Considerando que os aneuplóides com combinações menos toleráveis sejam degenerados e outros com combinações favoráveis possam ter continuado o desenvolvimento até ascósporos maduros e germinado posteriormente para fazer parte da fase vegetativa, certamente isto contribuiria para um polimorfismo cromossômico na fase mitospórica, como será visto no Capítulo 3. No entanto, sabe-se que para ocorrer uma segregação normal na meiose é necessário um prévio pareamento entre cromossomos homólogos de forma correta (Klein, 1994). Há casos onde ascósporos produzidos são viáveis mesmo com polimorfismo cromossômico (Zolan, 1995), sendo possível a viabilidade dos ascósporos com 5 ou 6 cromossomos como encontrados neste trabalho.

Poliplóides e aneuplóides são comuns em tecidos somáticos de organismos superiores, especialmente em cultura de tecido (Skirven, 1978; Yeoman e Forche, 1980). Knox-Davies e Dickson (1960) consideram que a ocorrência disto não é inesperada em micélios vegetativos de fungos em cultura, estes autores sugerem que este fenômeno é comum em fungos crescidos em condições de laboratório e mesmo em fungos que não apresentam a forma sexual ou meiospórica na natureza.

A média (Tabela 6) para o tamanho dos ascósporos encontrada foi de $19,7 \times 5,8 \mu\text{m}$, o que está próximo aos valores encontrados por Wheeler e Driver (1953) em *G. cingulata* isolado de *Ipomea* de $24,1 \times 5,4 \mu\text{m}$ e Kimati e Galli (1970) de $20 \times 6,5 \mu\text{m}$ em *G. cingulata* f. sp.

phaseoli. As diferenças encontradas são devidas às características genéticas próprias dos isolados, verificando-se que para o comprimento e largura, 96% e 98% da variação fenotípica é devida à variação genética (Tabela 6).

2.5 CONCLUSÕES

- a) *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* apresenta $n = 4$ cromossomos.
- b) Ocorre um controle genético diferente com relação à formação dos ascósporos quanto ao tempo de divisão celular, tamanho e ordenação final dos ascósporos no asco. Os resultados mostraram maiores diferenças entre isolados do que dentro de isolados, devido às características genéticas dos mesmos.
- c) No processo de formação de ascos, a meiose é seguida rapidamente de mitose, produzindo 8 ascósporos/asco, apesar de que falhas no processo de divisão celular (divisão assincrônica e cromossomos atrasados) levaram à aneuploidização e produção de 4 ou 6 ascósporos/asco.

Capítulo 3

POTENCIAL DE VARIAÇÃO EM *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner: EVIDÊNCIAS CITOLÓGICAS.

3.1. INTRODUÇÃO

O fungo *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner é o agente causal da antracnose no feijoeiro comum, doença muito importante nesta cultura (Rava e Sartorato, 1994), sendo mais comumente encontrado e conhecido nesta forma (mitospórica). A forma sexual (meiospórica) deste fungo só foi encontrada em condições de laboratório, sendo reconhecida com o nome de *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* (Sutton, 1992), sendo que alguns autores utilizam a denominação *G. cingulata* (Medeiros, 1988; VonArx 1981, citado por Sutton, 1992; Tu, 1992)

Os processos responsáveis pela variabilidade em *C. lindemuthianum* não foram perfeitamente demonstrados. Os fatores mais citados como responsáveis para originar novas características genéticas em fungos, são mutação ou provável recombinação parassexual ou

somática (Bradley, 1962) e há autores que afirmam que a única alternativa conhecida para a reprodução sexual é a recombinação somática (Esser e Kuenen, 1967).

Batista e Chaves (1982) mostraram em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (em condições de laboratório) novas combinações de caracteres e o aparecimento de novos genótipos através da recombinação sexual, constituindo também uma fértil e importante fonte de variação.

Com relação à recombinação parassexual, o estudo mais completo foi feito por Bos (1985). O autor verificou as possibilidades de heterocariose e recombinação somática neste fungo através da ocorrência de anastomoses entre hifas, crescimento de mutantes auxotróficos em meio mínimo e fusão de protoplastos. Seus resultados mostraram claramente heterocariose somente através da fusão de protoplastos. Bos (1985) considerou como prova positiva da recombinação somática, o isolamento do conídio recombinante, o que não foi conseguido. Dessa forma persiste ainda a dúvida se ocorre ou não, recombinação parassexual nesta espécie.

Este trabalho teve como objetivo buscar evidências citomorfológicas e citogenéticas que expliquem a variabilidade observada neste fungo.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 ISOLADOS

Foram utilizados 6 isolados de *C. lindemuthianum* dos quais 4 pertencem a raças fisiológicas diferentes e 2 são de raças desconhecidas. O material foi proveniente da micoteca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e estão apresentados na

Tabela 7. Os isolados foram repicados em placas com M₃ (Junqueira et al. 1984). A contagem do número de cromossomos foi realizada nos isolados 531, 1013 e 1002.

TABELA 7 Isolados de *C. lindemuthianum* utilizados. UFLA, Lavras, 1997.

ISOLADOS	531(re-isolado)*	1002	1003	1007**	1010*	1013*
RAÇAS	73	89	-	-	81	01
ORIGENS	EMBRAPA-CNPAF	Lavras-MG	Viçosa-MG	Lavras-MG	Lambari-MG	Patos - MG

* apresentam reprodução sexuada espontaneamente em meio de cultura.

** albino

3.2.2 CRUZAMENTOS A NÍVEL VEGETATIVO

Foram feitos cruzamentos para a observação de anastomoses entre os isolados 1013, 531, 1007 e 1002, em todas as combinações possíveis, com duas repetições cada. Os cruzamentos foram realizados em placas de petri com BDA e papel celofane, segundo Roane (1952). Os isolados foram repicados e colocados a uma distância de 4 cm um do outro. Mantiveram-se como testemunhas cada isolado crescido individualmente.

3.2.3 PREPARAÇÕES CITOLÓGICAS

A coleta do material das placas foi feita de diferentes formas para a montagem das lâminas.

Os micélios (hifas), crescidos em membrana de celofane foram corados segundo a Tabela 8, na própria membrana onde haviam crescido e na membrana de celofane que encontrava-se na região central da placa, onde ocorria o início de contato entre as hifas. A coleta e preparação foram realizadas até no máximo de 4 dias após a repicagem.

TABELA 8 Tratamentos aplicados para coloração de núcleos e cromossomos em conídios e hifas nos diferentes isolados avaliados. UFLA, Lavras, 1997.

Isolado	Fixação (horas)	Hidrólise HCl 60°C	Corante (horas)	Montagem de lâminas	Núcleo
1010	Carnoy acet. 4-24 h	1N 10 min.	Feulgen 8 h	Permanente	interfásico
531	Carnoy prop. 24 h		C-O prop. 24 h	Semi-permanente	divisão
	Carnoy acet. 4-24 h	1 N 10 min.	Feulgen 12 h	Permanente	interfásico, fragmentos
	Carnoy acet. 4-24 h	1N 10 min. *	Feulgen 12 h + C. acet. 12 h	Permanente	interfásico, fragmentos
1013	Carnoy prop. 24 h	-	C-O prop 12-22 h	Semi-permanente	divisão
	Carnoy acet. 4-24 h	1 N 10 min.	Feulgen 10-12 h	Permanente	interfásico
	Carnoy acet. 24 h	4 N 5 min	Giemsa 24 h	Semi-permanente e permanente	interfásico
1003	Carnoy acet. 24 h	1 N 10 min.	Feulgen 10-20 h	Permanente	interfásico
	Carnoy prop. 24 h	-	C. prop. 24 h	Semi-permanente	divisão
1007	FAA 1h	1 N 10 min.	Giemsa ½ h	Permanente	interfásico
	Carnoy prop.		C-O prop. 24 h	Semi-permanente	divisão
1002	Carnoy prop.	1 N 10 min.	C-O prop. 12 h	Semi-permanente	divisão
	FAA 1 h	1 N 10 min.	Giemsa 4 h	Semi-permanente	divisão
	Carnoy acet. 24 h	1 N 10 min	Feulgen 6 h + C acet. 6 h	Permanenee	interfásico

* conídios em anastomoses

Carnoy acet.= carnoy acético: 3 partes de álcool etílico absoluto e 1 parte de ác. acético glacial.

Carnoy prop.= carnoy propiônico: 3 partes de álcool etílico absoluto e 1 parte de ácido propiônico.

C. acet.= carmim acético 2%;

C. prop.= carmim propiônico 2%;

C-O prop.= carmim-orceína propiônica 2%;

Feulgen = reativo de Shiff, modificado por Coleman (1938, citado por Robinow, 1975);

Giemsa = corante Giemsa 2% em tampão fosfato pH 6,8.

Com exceção da mistura carmim-orceína que corou melhor os cromossomos da maioria dos isolados, a coloração foi feita segundo Robinow (1975), com modificações que dependeram do isolado e da condição em que se encontrava o núcleo (Tabela 8). As medições dos

núcleos interfásicos dos conídios, foi feita em suspensões aderidas às lâminas com adesivo de Haupts (Robinow, 1975) e corados segundo a Tabela 8.

A avaliação do número de cromossomos em conídios foi feita em lâminas semi-permanentes obtidas a partir de suspensão de conídios, coletados de colônias previamente coradas no meio de cultura, segundo a Tabela 8.

3.2.4 AVALIAÇÕES CITOLÓGICAS

As características avaliadas estão listadas a seguir:

Ocorrência de anastomoses. Observou-se o comportamento das hifas quanto a formação de anastomoses H e adjacentes e verificou-se a passagem de núcleo.

Tamanho dos conídios. Foram medidos com auxílio de uma ocular OSM, utilizando-se objetiva de 40x. Cem conídios foram escolhidos aleatoriamente em 5 lâminas diferentes. O tempo de cultura foi de no máximo 15 dias, para avaliação do comprimento e largura dos conídios.

Número de núcleos por conídio. Foi verificado o número de núcleos numa amostra de pelo menos 100 conídios.

Número de cromossomos. Uma vez determinada a melhor época em que encontrava-se maior número de conídios em divisão, foi feita a contagem dos cromossomos em conídios de todos os isolados (Tabela 7) a cada 7 dias, até 45 dias de cultura. Para os isolados 1002 e 531 realizaram-se contagens em 60 conídios escolhidos aleatoriamente de lâminas e placas diferentes, em que pelo menos dois tratamentos (Tabela 8) diferentes haviam sido empregados. No isolado 1013, fez-se a contagem em 5 placas diferentes com 5 lâminas cada uma e 10 células/lâmina.

2.2.5 FOTOMICROGRAFIAS

Foram feitas fotomicrografias em filme branco e preto asa 25 e 100. Os filmes foram revelados com D-72 (Dektol) e Microdol, respectivamente. As fotos foram reveladas em Dektol e copiadas em papel F3.

Algumas fotografias foram varridas em scanner 400 dpi branco e preto e posteriormente pseudocolorizadas em tons cinzas com os software Adobe Photoshop™ v.2,5 e Jandel SigmaScan® Pro v.2,0.

3.2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A avaliação do comprimento e largura de conídios foi realizada em delineamento inteiramente casualizado, de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

Y_{ij} : observação referente à repetição j do isolado i ;

μ : efeito de uma constante comum a todas as observações;

t_i : efeito aleatório do isolado i , $t_i \cap N(0, \sigma_g^2)$;

e_{ij} : efeito aleatório do resíduo associado à repetição j do isolado i , $e_{ij} \cap N(0, \sigma^2)$;

O esquema da análise de variância, bem como as esperanças dos quadrados médios, estão apresentados na Tabela 9.

Os componentes de variância foram estimados pelo método dos momentos, e a variação fenotípica entre médias de isolados foi estimada conforme:

$$\hat{\sigma}_f^2 = \hat{\sigma}_g^2 + \frac{\hat{\sigma}^2}{100}$$

na qual $\hat{\sigma}_f^2$ e $\hat{\sigma}_g^2$ são as estimativas dos componentes apresentados na Tabela 9.

TABELA 9 Esquema da análise de variância entre e dentro de isolados, com os graus de liberdade e esperanças dos quadrados médios. UFLA, Lavras, 1997.

Causas de Variação	GL	E(QM)
Isolados (entre)	5	$\sigma^2 + 100 \sigma_g^2$
Dentro	594	σ^2
Total	599	

Para o isolado 1013 foi feita uma avaliação do número de cromossomos, em delineamento inteiramente casualizado, onde uma estrutura hierárquica foi utilizada conforme o modelo a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + p_i + l_{(i)j} + e_{(ij)k}$$

Y_{ijk} : número de cromossomos no conídio k do isolado 1013, dentro da lâmina j dentro da placa i;

μ : efeito de uma constante comum a todas as observações;

p_i : efeito aleatório referente à placa i;

$l_{(i)j}$: efeito aleatório referente à lâmina j, dentro da placa i, $l_{(i)j} \cap N(0, \sigma_g^2)$;

$e_{(ij)k}$: efeito aleatório do conídio k, dentro da lâmina j, dentro da placa i, $e_{(ij)k} \cap N(0, \sigma^2)$;

O número de lâminas por placa e o número de observações por lâmina não foram constantes, caracterizando um desbalanceamento. As esperanças dos QM estão apresentadas na Tabela 10.

TABELA 10 Esquema da análises de variância e esperanças matemáticas dos quadrados médios do número de cromossomos nos conídios do isolado 1013. UFLA, Lavras, 1997.

Causas de Variação	GL	Esperança matemática
Placa	4	$\sigma^2 + 7,0553\sigma_1^2 + 21,366\sigma_p^2$
Lâmina (Placa)	10	$\sigma^2 + 8,0203\sigma_1^2$
Conídios (Placa x Lâmina)	112	σ^2
Total	126	

Para a característica número de cromossomos, realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade dos resíduos, e quando necessário, transformações do tipo \sqrt{v} foram feitas segundo Steel e Torrie (1980).

3.3. RESULTADOS

3.3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

Todos os isolados estudados formaram anastomose entre conídios em qualquer época da avaliação (7 a 40 dias). A maioria dos conídios livres encontravam-se no processo de germinação com 15-20 dias.

O isolado 1007 germinou rapidamente, com menos de 15 dias. Neste isolado a alongação dos conídios ocorreu algumas vezes sem ramificações, tendo sido observado aumento de até 4 vezes o tamanho do conídio. Neste isolado foi difícil encontrar núcleos em divisão sincrônica nos conídios livres na placa, o que impediu a generalização sobre o pico de divisão celular. Os conídios binucleados não apresentaram tamanho muito discrepante entre eles. A porcentagem destes encontra-se na Tabela 11.

TABELA 11 Média do comprimento e largura em micrômetros (μm) dos conídios e porcentagem dos conídios binucleados nos isolados com menos de 15 dias, em meio M_3 , UFLA, Lavras, 1997.

Isolados	Comprimento	Largura	% Binucleados
1010	12,790	5,018	0* ¹
531	14,254	6,557	2*
1013	13,217	4,824	0* ¹
1003	11,887	4,805	0,55* ²
1007	13,546	5,143	2*
1002	12,091	5,172	2*
número de observações	600	600	

* em 100 conídios; *¹ em 1000 conídios; *² em 548 conídios

As anastomoses entre conídios apresentaram septos nos isolados 1010, 1003 e 1002, sendo que alguns dos conídios dos isolados 1010 e 1003 não estavam septados, quando em anastomoses.

Nos isolados 1010, 1003 e 1002 foram encontrados acérvulos e apressórios em BDA com celofane, alguns destes apressórios eram binucleados (Figura 3a).

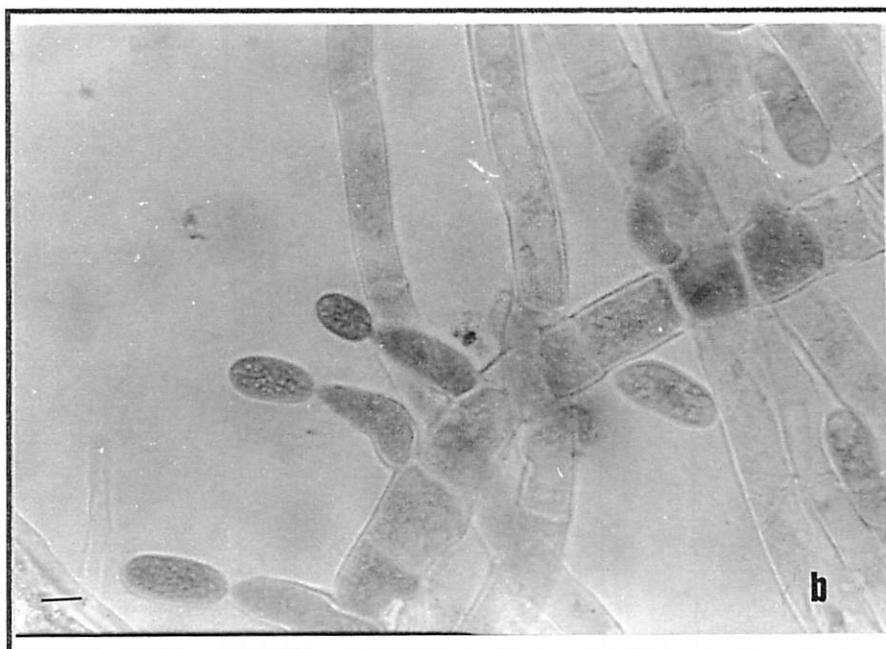


FIGURA 3 a - Isolado 1002: 15 dias em BDA com celofane, apressórios binucleados; **b** - isolado 531: 15 dias em BDA com celofane, produção de conídios em fialides. UFLA, Lavras, 1997. — 10 μ m

Os isolados produzem acérvulos de forma típica em cultura de *C. lindemuthianum*. Mas o isolado 531 produz também células conidiogênicas simples em fialides, produzindo conídios (Figura 3b).

3.3.2 CARACTERÍSTICAS DO ENCONTRO VEGETATIVO ENTRE ISOLADOS

Na testemunha do isolado 1002, observaram-se hifas em anastomose em H com passagem de núcleo (Figura 4a). Também foram observadas anastomoses adjacentes, com regiões coradas nas proximidades, mas sem nitidez para avaliar os núcleos.

Nos cruzamentos verificou-se incompatibilidade vegetativa através do crescimento helicoidal (Tabela 12). Utilizou-se o termo “crescimento helicoidal” para hifas com crescimento enovelado (Figura 4b), terminologia utilizada por Gooday (1995), coincidente com a forma de crescimento das hifas que não formaram anastomose e que tinham aspecto de repulsão. Os resultados dos cruzamentos, estão apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 Resultado dos cruzamentos entre isolados em BDA e celofane, com avaliação do crescimento helicoidal e formação de anastomoses entre hifas. UFLA, Lavras, 1997.

Isolados	1013	531	1007	1002
1013	-	anastomoses	crescimento helicoidal	anastomoses
531	-	-	crescimento helicoidal	●
1007	-	-	-	anastomoses
1002	-	●	-	-

- : difícil de definir o resultado; ● : perdidos

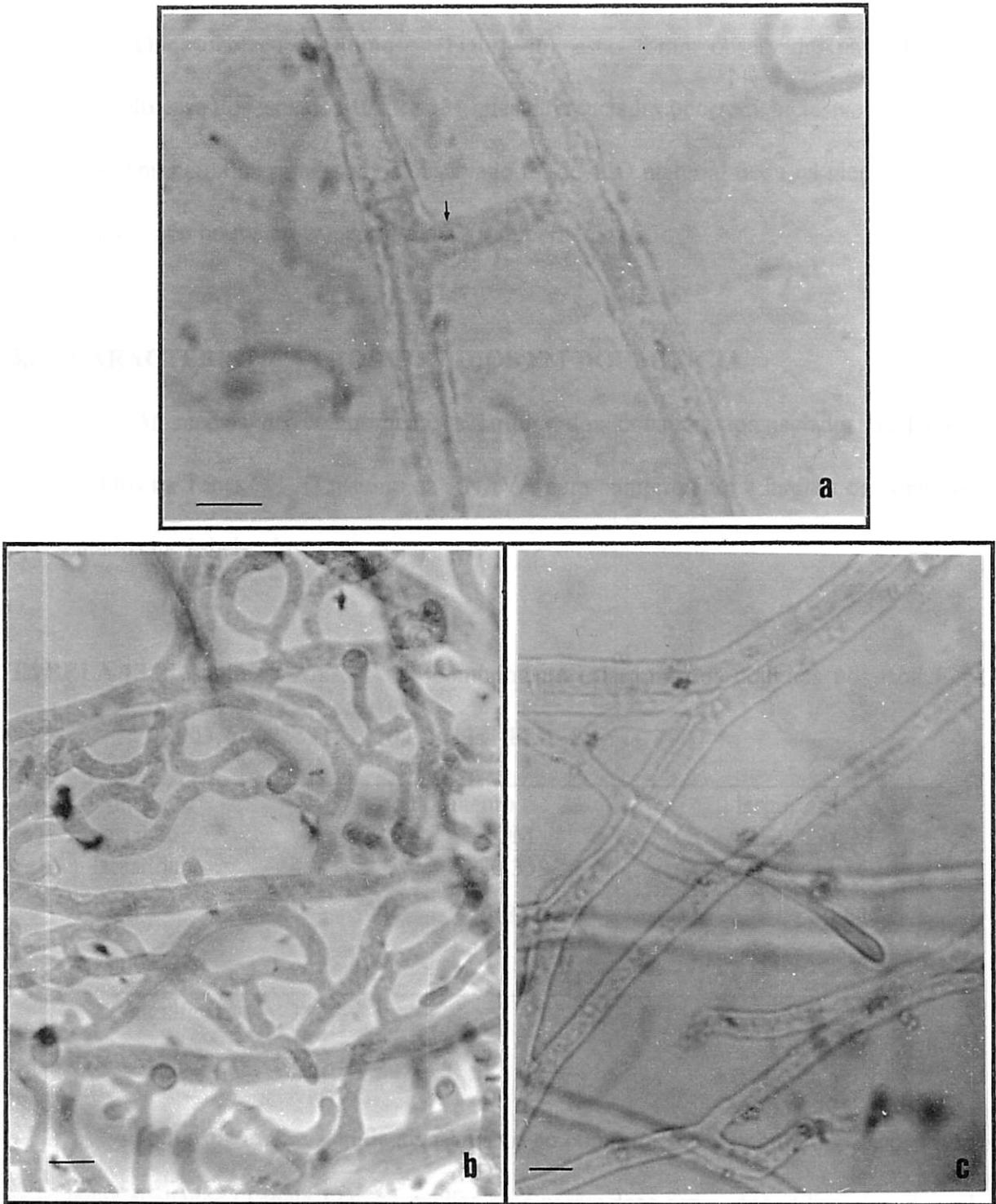


FIGURA 4 Meio BDA com celofane, **a** - Isolado 1002 15 dias; **b** - crescimento helicoidal: isolados 1007 x 1013 4 dias; **c** - anastomoses: isolados 531 x 1013 4 dias. UFLA, Lavras, 1997. — 5 μ m

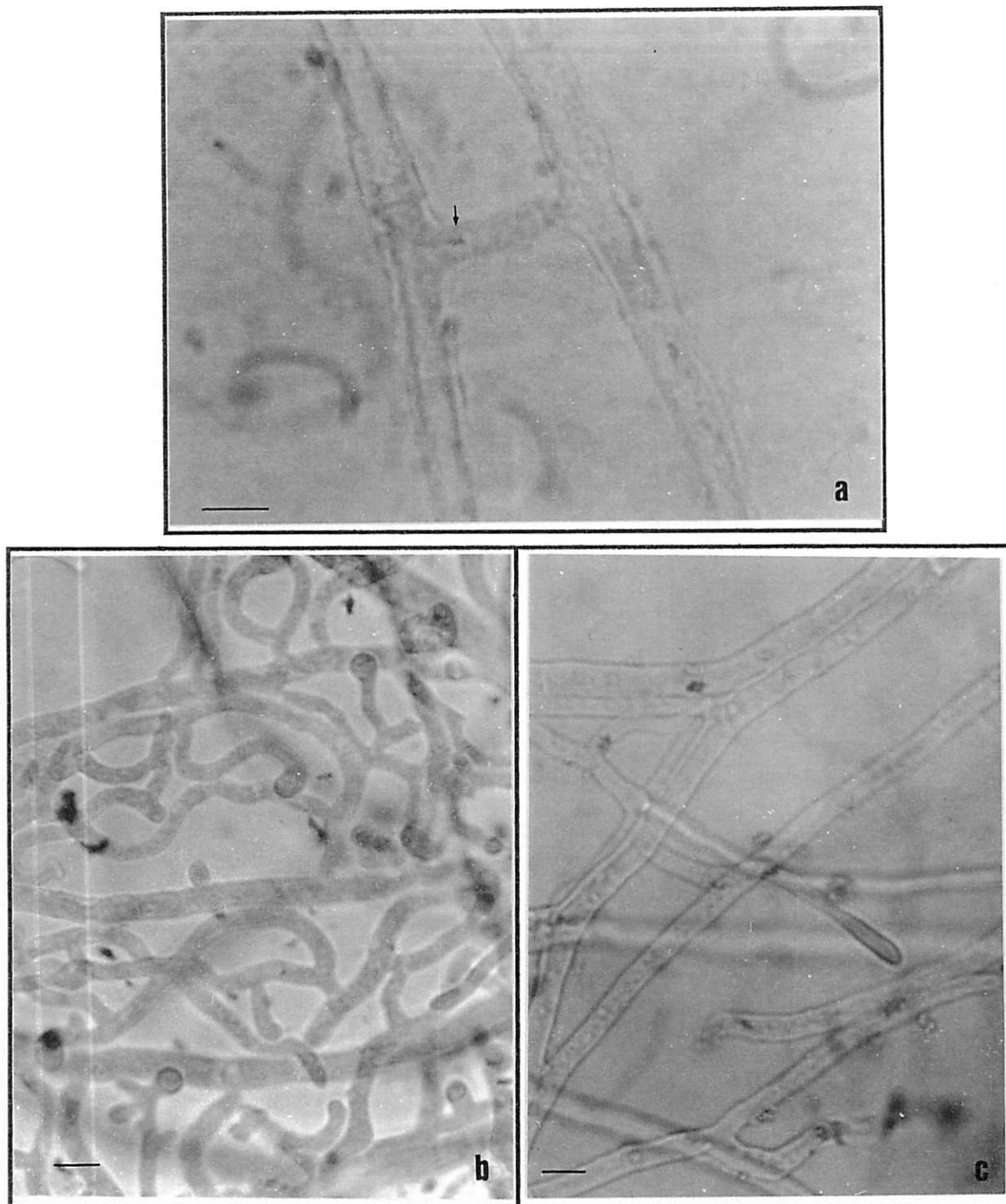


FIGURA 4 Meio BDA com celofane, **a** - Isolado 1002 15 dias; **b** - crescimento helicoidal: isolados 1007 x 1013 4 dias; **c** - anastomoses: isolados 531 x 1013 4 dias. UFLA, Lavras, 1997. — 5 µm

Onde ocorreu anastomoses (Figura 4c), estas foram observadas na forma de H ou adjacente. No caso dos isolados 1013 e 531 hifas diferenciadas ocorrem, inclusive com núcleos em divisão, e o número de cromossomos observado foi de 4. O material ficou na placa por um tempo prolongado e não houve cruzamento sexual (sem peritécios).

3.3.3 CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS EM DORMÊNCIA

As médias do comprimento e largura dos conídios dos isolados avaliados estão apresentados na Tabela 11. O resumo da ANAVA para comprimento e largura de conídios, estão apresentados na Tabela 13.

TABELA 13 Resumo da ANAVA do comprimento e largura dos conídios nos isolados 1007, 1003, 1002, 531, 1010 e 1013. UFLA, Lavras, 1997.

Fontes de variação	comprimento		largura	
	GL	QM	GL	QM
Isolados	5	80,339 **	2	43,169 **
Erro	594	1,888	594	0,529
Total	599		599	

** significativo a 1%

Houve diferenças significativas quanto ao comprimento e largura dos ascósporos entre os isolados avaliados (Tabela 13). As médias e os parâmetros estimados utilizando os quadrados médios da Tabela 13 são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 Estimativas dos parâmetros para a amostragem dos conídios com menos de 15 dias.

UFLA, Lavras, 1997.

	m	CV	σ_g^2	σ_f^2	h²	CVg
Comprimento	12,964	10,60 %	0,7845	0,8034	97,65%	6,05%
Largura	5,253	13,85 %	0,4264	0,4317	98,77%	8,4%

3.3.4 CARACTERÍSTICAS DOS CONÍDIOS EM DIVISÃO

3.3.4.1 Isolado 1013

Com 15-20 dias, os conídios estavam muito sensíveis e facilmente estouravam. A partir de 20 dias começaram a germinar e a divisão prolongou-se até 30-40 dias, não necessariamente com tubos germinativos, e podendo apresentar anastomoses entre eles. Embora as anastomoses tenham sido mais freqüentes aos 15 dias. Foi observada uma variação de 2 a 16 cromossomos nos núcleos (Figuras 5a e 5b). A média foi de 5 cromossomos/núcleo (Figura 6a), a moda foi 4 cromossomos/núcleo e um CV de 12,43 %. O resumo da ANAVA feita neste isolado para o número de cromossomos está apresentado na Tabela 15.

3.3.4.2 Isolado 531

Com 20-30 dias de cultura foram encontrados conídios livres germinando (Figura 6b). Os núcleos estavam em divisão tanto nos conídios uninucleados como nos binucleados (Figura 6c). Na prófase aparecia uma área heteropicnótica maior identificada como o nucléolo (Figura 6c). Em alguns conídios em intérfase foram observados micronúcleos (Figura 6d).

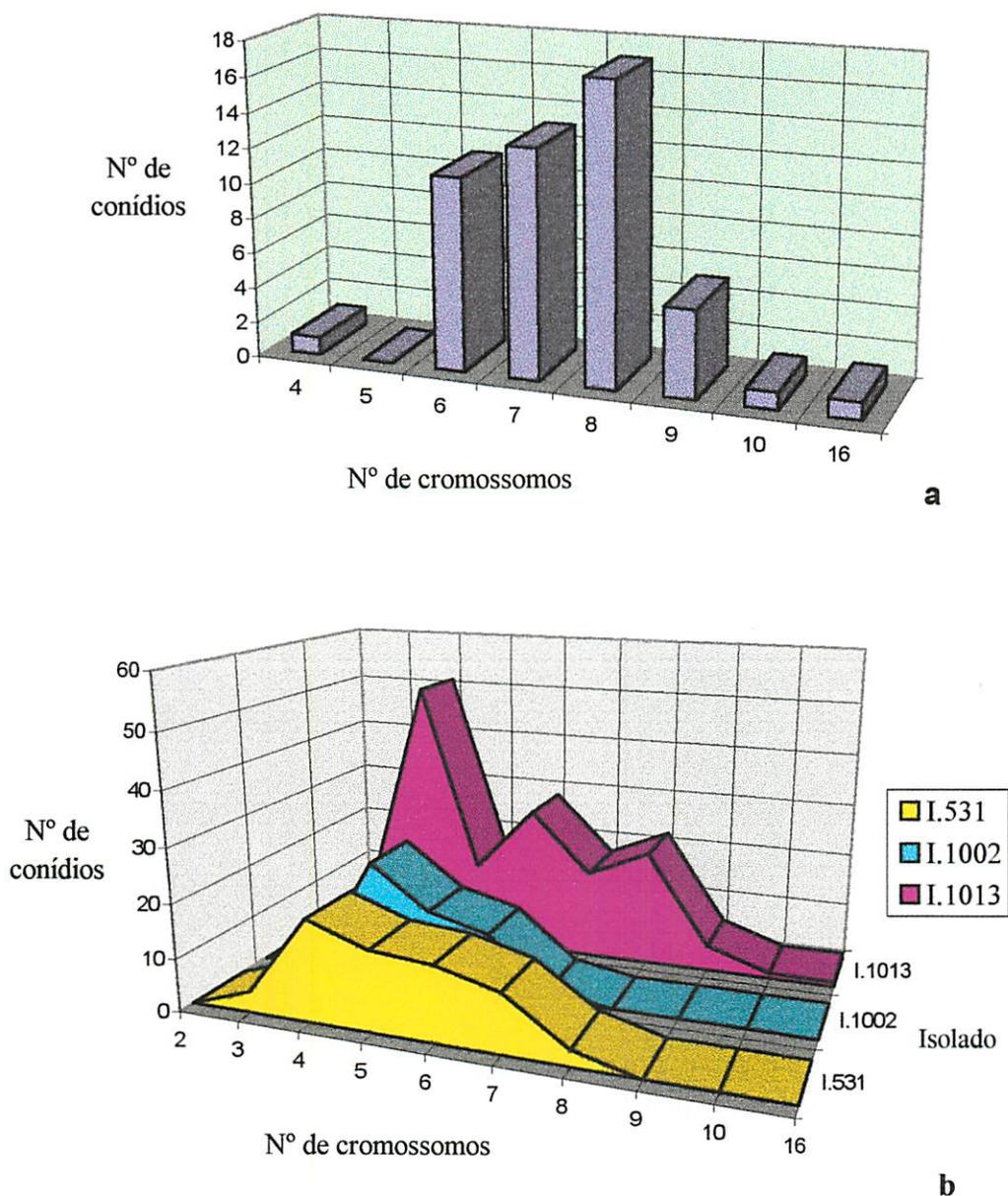


FIGURA 5 **a** - Número de conídios x número de cromossomos, no isolado 1013 em uma amostra de uma placa com meio M_3 de cultura; **b** - número de conídios x número de cromossomos, nos isolados 531, 1002 e 1013 em meio de cultura M_3 . UFLA, Lavras, 1997.

TABELA 15 Resumo da ANAVA para o número de cromossomos/núcleo em conídios do isolado 1013 em 30 dias de cultura. UFLA, Lavras, 1997.

Fontes de Variação	GL	QM
Placa	4	1,6717 **
Lâmina(Placa)	10	2,14 *
Conídios (Placa x Lâmina)	112	0,0790
Total	126	

** significativo a 1 % de probabilidade;

* significativo a 5 % de probabilidade.

Observação: A SQ é do tipo III

Os núcleos em metáfase encontravam-se com maior frequência numa posição polar (Figura 6e) e menos frequentemente em posição equatorial (Figura 6b). Foram encontrados com maior frequência 4 cromossomos. Quando observava-se mais de 4, normalmente 2 eram maiores, 1 de tamanho médio, e uma variação de 1 a 3 cromossomos muito pequenos. Houve diferenças entre 2 lâminas, sendo que uma delas apresentou nitidamente uma média de 4 cromossomos e a outra de 7 cromossomos/células (Figura 6e). A variação no tamanho dos cromossomos na metáfase foi de 0,26 μm a 0,57 μm aproximadamente, onde se encontravam mais condensados.

Com relação às anastomoses, no início de sua formação o núcleo pode encontrar-se perto da alongação, no meio desta ou evidenciando fusão (Figura 6f). Em quase todos os conídios em anastomose deste isolado, que foram avaliados, encontrou-se de 1 a 3 micronúcleos (Figura 6g). Também foram encontradas anastomoses formadas por mais de dois conídios. Das 60 anastomoses entre 2 conídios avaliados: 38,18% tinham 1 conídio binucleado; 5,46% tinham os dois conídios binucleados e 9,09% estavam com micronúcleos de formato alongado ou em forma

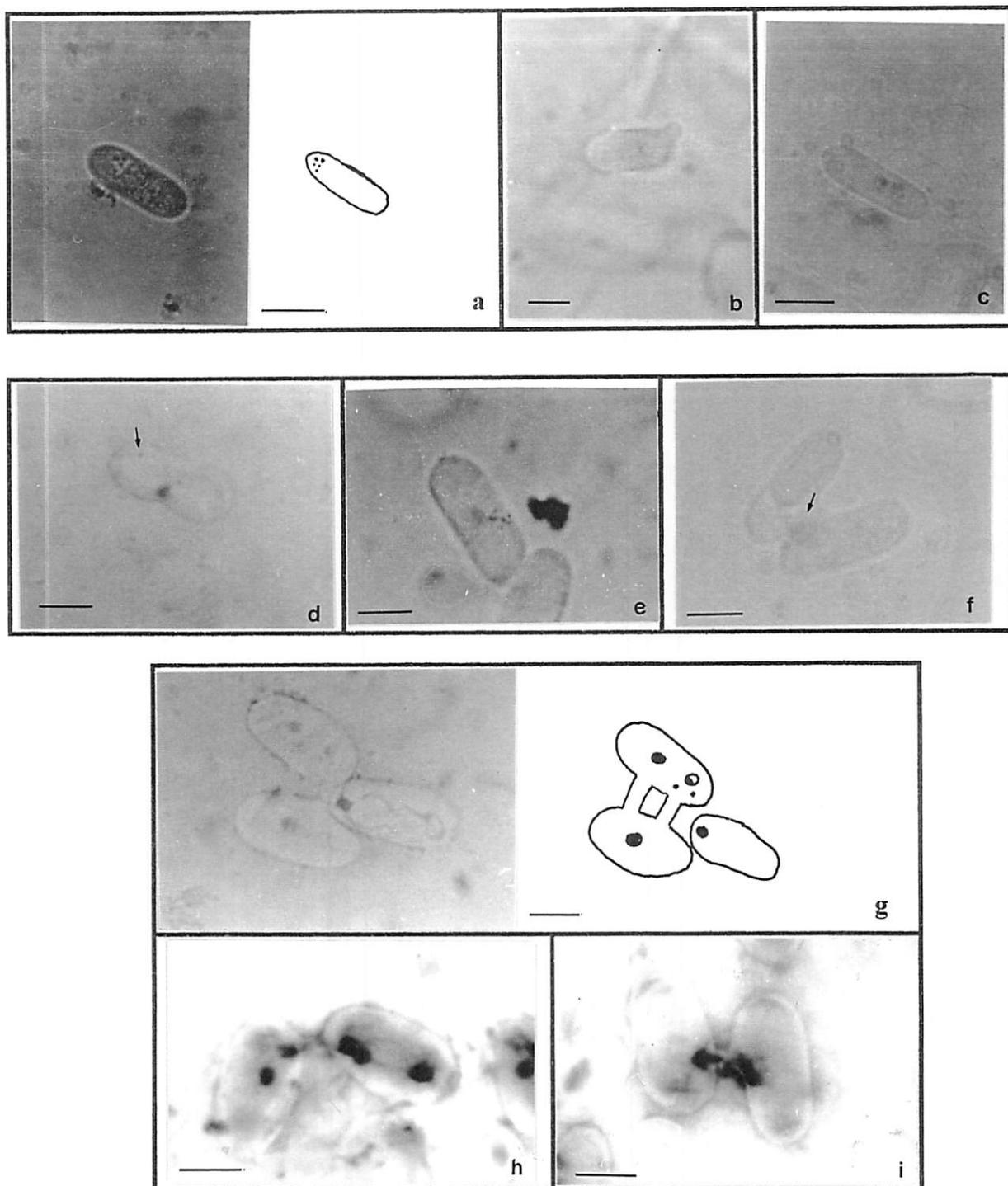


FIGURA 6 a - Isolado 1013: conídios com 5 cromossomos; b - isolado 531: conídio germinando; c - isolado 531: conídio binucleado com ambos núcleos em prófase; d - isolado 531: conídio com 3 micronúcleos; e - isolado 531: conídio com 7 cromossomos; f - isolado 531: fusão de núcleos; g - isolado 531: 2 pontes, presença de micronúcleos; h - isolado 1002: Anastomose e conídios com 2 e 3 núcleos; i - isolado 1002: Anastomose e passagem de núcleo. UFLA, Lavras, 1997. — 5,0 μm

de v nas anastomoses. Também foram encontradas anastomoses duplas entre conídios (Figura 6g), as quais não foram quantificadas.

3.3.4.3 Isolado 1002

Nos acérvulos foram encontrados muitos dos conídios em anastomose (Figura 6g e 6h), núcleos no início (Figura 6h) e também com formato alongado na anastomose (Figura 6i). Também, dentro dos acérvulos, observou-se muitos conídios binucleados e trinucleados (Figura 6h). Houve dificuldade em avaliar-se com precisão a frequência destas observações pela grande quantidade de conídios, sendo difícil a sua dispersão nas lâminas e o controle para fazer as amostragens.

Observou-se variação no número de cromossomos dos conídios (Figura 5b), sendo a média e moda 4 (Figura 7a). Estruturas maiores foram identificadas como o nucléolo (Figura 7a). Também foram observados conídios com 5-6 cromossomos pequenos quando o nucléolo estava ainda presente (Figura 7b). Quando o conídio apresentava 6 cromossomos, os 2 cromossomos maiores apresentavam-se próximos (Figura 7c).

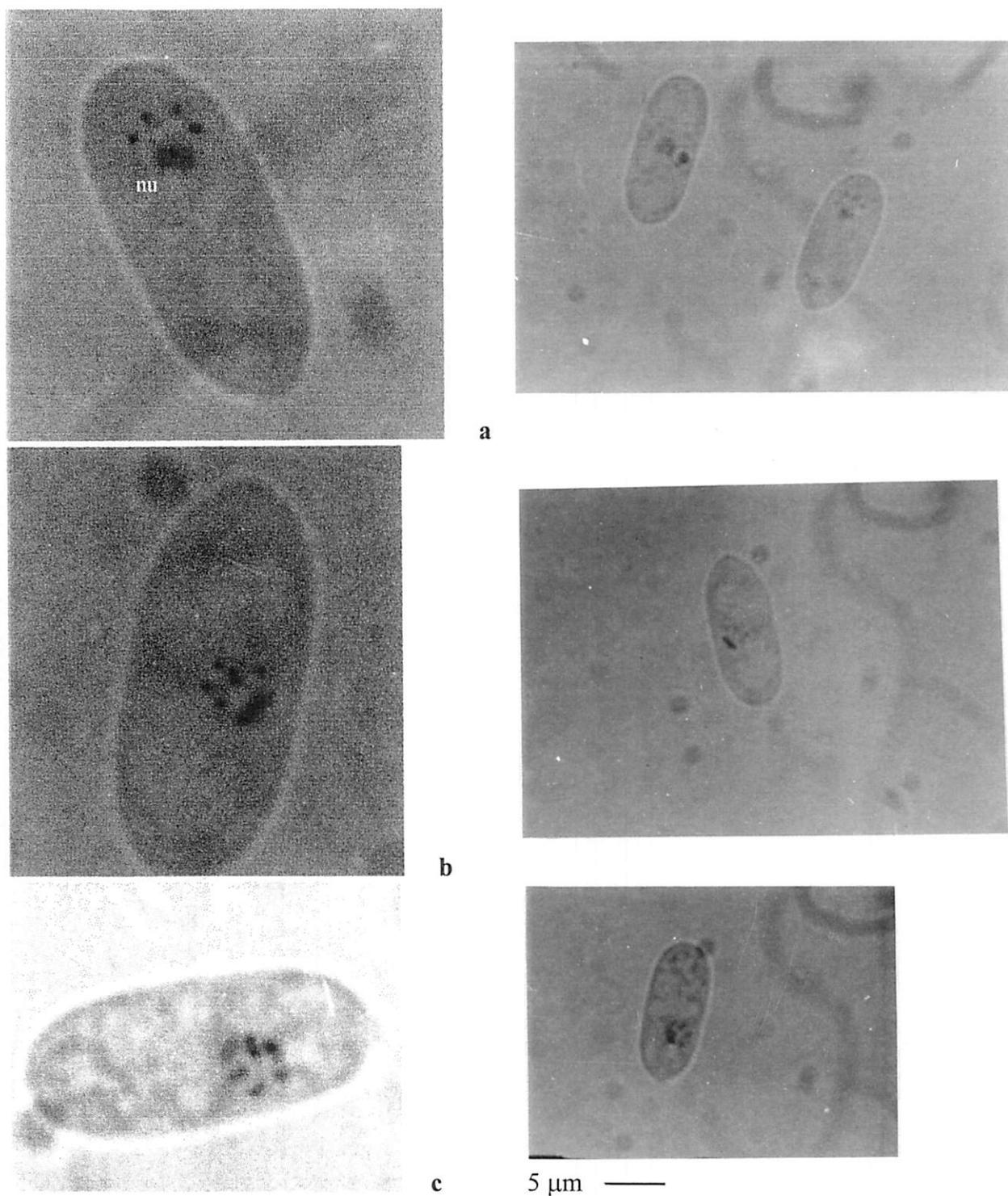


FIGURA 7 Isolado 1002 com 30 dias em meio M_3 ; **a** - conídio com 4 cromossomos e nucléolo; **b** - conídio com 5 cromossomos; **c** - conídio com 6 cromossomos. UFLA, Lavras, 1997.

3.4 DISCUSSÃO

A necessidade de uma metodologia variada para a observação dos conídios pode ser explicada pelo estágio fisiológico em que os mesmos se encontravam: dormência ou germinação. Logo no início da cultura eles possuíam uma grossa parede celular e muitos vacúolos no citoplasma o que provavelmente dificultou a penetração dos corantes. À medida que o tempo passou, as reservas esgotaram-se e a parede celular tornou-se flexível em função do alongamento que a mesma deverá sofrer para dar início à formação do tubo germinativo, como verificado através de estudos sobre ultraestrutura realizados em *Colletotrichum lindemuthianum* (trabalhos em andamento) e para outros fungos (Griffin, 1981; Isaac, 1996). Na maioria das células em metáfase não foi visualizado o tubo germinativo. Isso talvez não possa ser generalizado, uma vez que nestas condições, isto é, sem o tubo germinativo, fica mais fácil a observação microscópica, pela menor interferência da profundidade de campo.

Em leveduras, onde vários trabalhos a nível de biologia celular e citogenética têm sido realizados, também há a necessidade de metodologias diferentes entre isolados de uma mesma espécie (Wheals, 1996)*. Neste trabalho a maior variação na metodologia entre os isolados, ocorreu para o tempo de coloração.

3.4.1 CARACTERÍSTICAS DO MICÉLIO VEGETATIVO

A demonstração de anastomoses sem a presença de núcleos provavelmente se deva a uma amostra muito pequena e à avaliação feita no início do encontro, quando a quantidade de hifas é menor.

*Dr. A. Wheals, University of Bath, School of Biology and Biochemistry, Bath, Inglaterra.

Hifas em crescimento helicoidal foram observadas nos encontros entre as combinações dos isolados 1013 x 1007 e 531 x 1007 (Figura 4b). Gooday (1995) descreveu o crescimento helicoidal em hifas de *Candida albicans* quando crescidas em superfícies de membranas de celofane e citou outros trabalhos onde ocorreu o mesmo em meio de cultura. O autor não relacionou este tipo de crescimento à repulsão entre isolados, mas sim a um tipo de crescimento que pode ser afetado por características do meio ou características próprias do isolado (mutantes). O crescimento helicoidal (embora não chegue a fechar em círculos) nos isolados de *C. lindemuthianum*, mostrou características de incompatibilidade vegetativa devido a impressão de repulsão entre as hifas, pelo tipo de crescimento e por não ter-se observado regiões de contato. Este tipo de crescimento não apresentou-se nas testemunhas.

Nas testemunhas foi possível visualizar a migração de núcleos entre hifas H (Figura 4a). O formato destes núcleos era alongado nas anastomoses, enquanto que os das hifas eram arredondados. Vários autores relacionam a modificação do formato do núcleo com migração dentro de uma célula ou de uma célula para outra, tanto na fase mitospórica como na fase meiospórica de fungos (Knox-Davies e Dickson, 1960; McCully, Kathleen e Robinow, 1971; Ashton e Moens, 1982).

3.4.2 PRODUÇÃO E CARACTERÍSTICAS DE CONÍDIOS

3.4.2.1 Produção de conídios

A maior quantidade de conídios normalmente forma-se a partir de acérvulos, como é o mais comum e característico para esta espécie (Krugner e Bacchi, 1995). A produção de conídios em hifas diferenciadas e não em acérvulos foi encontrada mas com baixa frequência e só no

isolado 531 (Figura 3b). Outros autores também encontraram este tipo de reprodução em *Colletotrichum gloeosporioides* isolado de morango (Uecker, 1994). Certamente a contribuição na produção de conídios através desta forma, foi pouca nas condições de laboratório em que realizou-se esse trabalho, tendo sido a produção em acérvulos a mais eficiente.

Nos acérvulos do isolado 1002, observou-se grande quantidade de conídios binucleados e trinucleados (Figura 6h), de tamanho característico ao dos conídios livres. Essas características e a grande quantidade de anastomose com passagem de núcleo encontrada nos acérvulos, sugerem uma intensa troca de material genético nesta fase de reprodução. Isto permitiria recombinação somática que levaria à variação, quando material genético diferente estivesse envolvido.

3.4.2.2. Características dos conídios

Analisando-se as placas com meio de cultura verificou-se que os conídios livres estão em dormência, até os 15 dias. O processo de divisão começa e alcança seu pico em torno de 30-40 dias. O período de dormência nos conídios deve estender-se ao máximo quando eles estão juntos em grande quantidade no micélio vegetativo, já que ao realizar-se repicagens, mesmo com 15 dias, a dormência é quebrada rapidamente. Apesar da dormência, conídios em anastomose são encontrados em qualquer época, embora sua frequência tenha sido maior aos 15 dias.

O tamanho médio dos conídios em dormência foi de 12,96 μm de comprimento e 5,25 μm de largura (Tabela 14), sendo estes valores um pouco maiores dos descritos por Sutton (1992) para caracterizar *C. lindemuthianum* (9,5-11,5 x 3,5-4,5 μm) e mais próximos dos valores que Rava e Sartorato (1994) delimitaram na sua revisão (13-22 x 4,4-5,3 μm) sobre esta espécie. Nas análises estatísticas realizadas encontraram-se diferenças entre os isolados quanto ao tamanho dos

conídios. No comprimento e largura 98 % e 99% da variação fenotípica encontrada foi devida à variação genética (Tabela 14).

Durante a divisão mitótica em conídios de *C. lindemuthianum*, a prófase ocorreu como em outros fungos conidiais, com o nucléolo sendo observado como uma região mais intensamente corada. Robinow (1981) comentou que o núcleo das hifas em relação ao dos conídios é muito pequeno dificultando a sua observação no microscópio óptico e também a falta de afinidade comorceína acética. Neste trabalho, as melhores preparações resultaram da mistura deorceína e carmim acético e/ou propiônico, que corou facilmente o nucléolo o qual tem tamanho semelhante aquele observado no Capítulo 2, na fase meiospórica (aproximadamente 0,4-0,7 μm). Nos conídios binucleados a prófase ou prometáfase ocorreram de forma sincrônica, sugerindo o mesmo grau de condensação para os dois complementos cromossômicos. Isto facilitaria uma fusão posterior entre estes dois núcleos o que geraria um núcleo heterozigoto se eles fossem diferentes.

Na metáfase a maioria dos núcleos estão em posição polar, mostrando-se um arranjo numa área mais clara de formato arredondado, diferente do resto do citoplasma, aproximadamente de 2 μm , que deve estar sendo delimitado pela carioteca, mostrando que esta provavelmente não é desintegrada como ocorre com a maioria dos fungos (Robinow e Caten, 1969; Zickler, 1970; Wells, 1970). A observação de conídios com e sem nucléolo (Figura 7a e 7c) indica que esse desaparece no final da metáfase.

A moda de 4 cromossomos foi comum para todos os isolados avaliados (531, 1013 e 1002) na divisão celular (Figura 5b). Em seqüência à moda de 4, as maiores freqüências encontradas foram 5 e 6 cromossomos. A média diferente encontrada (isolado 1013 = 5 cromossomos; isolados 531 e 1002 = 4 cromossomos) é explicada pela presença de núcleos com

valores extremos de 2 e 16 cromossomos no isolado 1013, já que a média é um tipo de medida de posição, muito suscetível quando valores extremos estão presentes.

3.4.3 FONTES COM POTENCIAL DE VARIAÇÃO: EVIDÊNCIAS CITOLÓGICAS

As avaliações citológicas deram provas de três fontes com potencial de variação em *C. lindemuthianum*: troca de material nuclear através de anastomose entre conídios, polimorfismo cromossômico e os passos para que ocorra o ciclo parassexual.

3.4.3.1 Troca de material nuclear através de anastomose entre conídios

São vários os trabalhos que tem mostrado a formação de anastomoses entre esporos de fungos (Schreiber e Green, 1966; Giatgong e Frederiksen 1969; Uecker, 1994) e que enfatizam a sua importância como fonte de variabilidade para gerar novas características genéticas (Watson, 1957; Schreiber e Green, 1966; Giatgong e Frederiksen, 1969; Bartos et al. 1969 e Sharma e Prasad, 1970 citados por Camargo, 1995). Neste trabalho ficou evidente que ocorre a passagem e troca de material genético (Figuras 6d, 6f, e 6i), tanto de núcleos inteiros, o que facilitaria a posterior fusão de núcleos, como de fragmentos cromossômicos, os quais foram observados como micronúcleos de formato alongado ou em forma de v nas anastomoses, evidenciando migração.

A presença de micronúcleos nos conídios de *C. lindemuthianum* indica que foi perdido material genético durante a divisão celular em consequência de quebras e/ou a ocorrência de cromossomos atrasados, os quais se mantêm por um tempo no citoplasma até serem degenerados ou transferidos para outra célula, já que sua presença não é comum em todos os conídios em dormência. Por outro lado, Brown e Bertke (1979) citam que os micronúcleos e as células que os

originaram não são mantidos. O que significa que os conídios com micronúcleos poderiam ser ou não degenerados, já que neste experimento não foi possível mostrar a viabilidade destes.

A visualização de anastomoses não garante a sua eficiência como fonte de variabilidade. No entanto, o grande número de células envolvidas pode garantir que núcleos diferentes se encontrem, gerando condições favoráveis e aumentando a variabilidade.

A ocorrência de anastomose entre células permite também a ocorrência de heteroplasiose, já citada por outros autores como fonte de variação em fungos, por estar relacionada a fatores citoplasmáticos ou à herança extracromossômica (Azevedo, 1976; Hastie, 1981). Desta forma, há também a possibilidade de fatores citoplasmáticos terem efeito sobre a variabilidade em *C. lindemuthianum*.

3.4.3.2 Polimorfismo cromossômico

No capítulo 2 foi descrita a meiose, onde foi observado assincronismo na divisão entre os núcleos dos ascos, cromossomos atrasados na anáfase, núcleos com 5-6 cromossomos e ascos maduros com 4 e 6 ascósporos. Considerando que aneuplóides produzidos na fase meiospórica possam ser conservados, estes poderiam contribuir para um polimorfismo cromossômico numérico na fase mitospórica, uma vez que mutações podem afetar tanto a mitose como a meiose (Baker et al. 1976). Deve ser lembrado que o ciclo sexual não foi encontrado na natureza e como tal só é mostrado seu potencial como fonte de variação.

Masel et al. (1990), encontraram em *C. gloeosporioides* (isolado de *Stylonsanthes* spp.), variação no tamanho e número de mini-cromossomos o que permitiu a classificação destes isolados em dois grupos em função destes mini-cromossomos e do número de cromossomos maiores, que era constante em cada tipo, por eles determinados. Segundo os autores o tipo A tem

5 cromossomos e 8-10 mini-cromossomos e, o tipo B, 3 cromossomos e 3-5 mini-cromossomos. Levando em conta o limite de resolução do microscópio de campo claro, os números por eles encontrados coincidem com os observados neste trabalho, apesar de Masel, Irwin e Manners (1993a) não terem encontrado mini-cromossomos em um isolado de *C. lindemuthianum*. Em *C. gloeosporioides* isolado de *citrus*, Liyanage, McMillan e Kistler (1992) também encontraram arranjos similares aos apresentados por Masel et al. (1990).

Manners et al. (1992) também questionaram a variação no número e tamanho dos mini-cromossomos. Com relação a este ponto, os autores mostraram através de hibridações de DNA, que as repetições dispersas observadas são comuns nos cromossomos e mini-cromossomos, sugerindo que eles são parte de um mesmo sistema. Assim estes autores sugerem que há probabilidade de ocorrer o que ocorre com *Plasmodium* (McConkey, Waters e McCuthan, 1990) onde rearranjos cromossômicos ocorrem como resultado de um efeito de seleção, ou ainda, poderia estar ocorrendo uma recombinação somática e isto levaria à formação de heterocários e diplóides transcendentais. Recentemente, Masel et al. (1996), utilizando mutantes auxotróficos pertencentes a dois biótipos (Tipos A e B) de *C. gloeosporioides* isolados de *Stylosanthes*, verificaram através de técnicas moleculares, que há mini-cromossomos nos isolados do biótipo B que originaram-se por transferências “horizontais” recentes a partir do biótipo A. Sugerindo que esta transferência ocasional de cromossomos específicos entre os isolados mitospóricos ocorreu de forma genética.

Nos conídios com 4 cromossomos foi mais constante a presença de 1 cromossomo maior e com formato de bastão, um cromossomo médio, também com formato de bastão e dois menores que apareceram em forma de pontos e sempre próximos. Quando mais de 4

cromossomos estavam presentes, ou observava-se 2 grandes e os demais menores arredondados, ou, todos eram pequenos e com forma arredondada (Figura 7c). Isto poderia sugerir que cromossomos pequenos, extras, originavam-se a partir de quebras dos cromossomos maiores. Recentes estudos em meiose de *Nectria haematococca* (Miao, Covert e VanEtten, 1991) utilizando técnicas moleculares, mostraram que mais do que a não-disjunção, algumas deleções e adições em cromossomos maiores alteram o fenotipo esperado. Essas deleções foram associadas aos fragmentos, pelos resultados de hibridação de DNA com seqüências sempre coincidentes, os quais foram caracterizados como cromossomos B, pela associação com características fenotípicas dispensáveis. Estes autores sugerem que estas seqüências coincidem com regiões dos cromossomos que facilitariam as quebras e fusões de fragmentos e que certamente estão contribuindo com a variação cariotípica encontrada na espécie com a qual eles trabalharam. Em *C. gloeosporioides* isolado de *Stylosanthes* spp. também foi mostrado por Masel, Irwin e Manners (1993b) através do emprego de várias técnicas moleculares, que grande quantidade de DNA, e possivelmente cromossomos inteiros são arranjados através de deleções e adições de seqüências de DNA, que têm contribuído para o polimorfismo existente neste fungo.

Os mini-cromossomos observados em *N. haematococca* e em *C. gloeosporioides* são de aproximadamente 1,6 Mb e 1,2 MB respectivamente, e estariam provavelmente fora do limite de resolução do microscópio óptico, para serem identificados com exatidão neste trabalho. Por outro lado, Zolan (1995) também descreve numa revisão que em vários fungos já foram descritos elementos transponíveis que podem gerar polimorfismo cromossômico.

A variação no tamanho e número de cromossomos entre valores próximos, como os observados neste trabalho e por outros autores, poderia ser devida, em parte, à falhas na

metodologia como aparecimento de artefatos ou a erros de interpretação, uma vez que alguns cromossomos têm dimensões próximas do limite de resolução do microscópio de campo claro. Por outro lado, em várias ocasiões essa variação não deixou dúvida, sendo relacionada a um polimorfismo numérico que varia entre 4-6 cromossomos e os valores extremos encontrados os quais foram considerados aneuplóides de vários níveis e que são discutidos posteriormente quando da apresentação do Ciclo Parassexual.

A análise estatística realizada com os dados obtidos com o isolado 1013 (Tabela 15) permite esclarecer a variação no número de cromossomos encontrada. Em virtude do tamanho muito reduzido dos cromossomos, é razoável admitir que haja um certo nível de erro de leitura na avaliação de cada célula individualmente. Entretanto, admitindo que este erro tenha sido aleatório e independente da lâmina e da placa onde foi feita a coleta de material, os resultados da Tabela 15 evidenciam uma variação no número de cromossomos que não é devido ao erro humano. Ou seja, as diferenças entre placas, e ainda entre lâminas montadas de uma mesma placa, ilustram a presença de fatores que provocam variações reais no número de cromossomos, de natureza biológica, e não devida às dificuldades de avaliação.

Por outro lado, a produção de aneuplóides, como resultado de sucessivas repicagens em culturas mantidas em laboratório, poderia explicar a instabilidade mitótica e a perda de vigor de fungos de cultura repicadas muitas vezes, como sugerido por Knox-Davies e Dickson (1960). Isso também acontece com cultura de tecido vegetal (Skirven, 1978; Yeoman e Forche, 1980), onde encontram-se quimeras de ploidia no tecido regenerado, como também variação no número e tamanho dos cromossomos nos calos (Wang, Hang e Tsuchiya, 1991). No entanto, relacionar a ocorrência de variações às condições de cultura somente, seria um critério muito restrito, já que

estes polimorfismos tem sido encontrados em trabalhos com isolados da natureza. McDonald e Martinez (1991) encontraram polimorfismo cromossômico em *Septoria tritici* em campos de trigo.

Em trabalhos mais recentes autores têm formulado a hipótese, baseando-se em trabalhos próprios e em muitas revisões, apostando nas possibilidades do aumento da variabilidade nos fungos que não apresentam o ciclo sexual (ou a fase meiospórica) na natureza. Neste sentido, Kistler e Miao (1992) formularam uma hipótese onde propõem uma correlação negativa entre a frequência da fase meiospórica (na natureza) e a presença de polimorfismo cromossômico em fungos fitopatogênicos.

3.4.3.3 Ciclo Parassexual

Pelo grande número de raças que ocorrem em *C. lindemuthianum* (Rava et al. 1993; Rava, Purchio e Sartorato, 1994; Balardin, 1997) pode-se perceber que, a alta variação apresentada por este fungo, não poderiam ser totalmente explicada com a ocorrência de mutação. Um substituto do ciclo sexual, é o ciclo parassexual. Também sabe-se que a forma sexual (meiospórica) não foi encontrada na natureza e só poucas vezes em condições de laboratório (Kimati e Galli, 1970; Batista e Chaves, 1982; Bryson et al. 1992; Mendes-Costa, 1996).

Neste trabalho, todas as provas citológicas necessárias para a ocorrência do ciclo parassexual foram encontradas; sugerindo-se o ciclo de vida em *C. lindemuthianum* na Figura 8, e discutidos os passos a seguir:

1) Anastomose entre células. A ocorrência de plasmogamia entre células (hifas e conídios) garante o início do ciclo. Bos (1985) demonstrou citologicamente a ocorrência de anastomose entre hifas de forma freqüente entre isolados diferentes de *C. lindemuthianum*. No entanto, percebe-se neste trabalho, que a maior contribuição para anastomose e plasmogamia

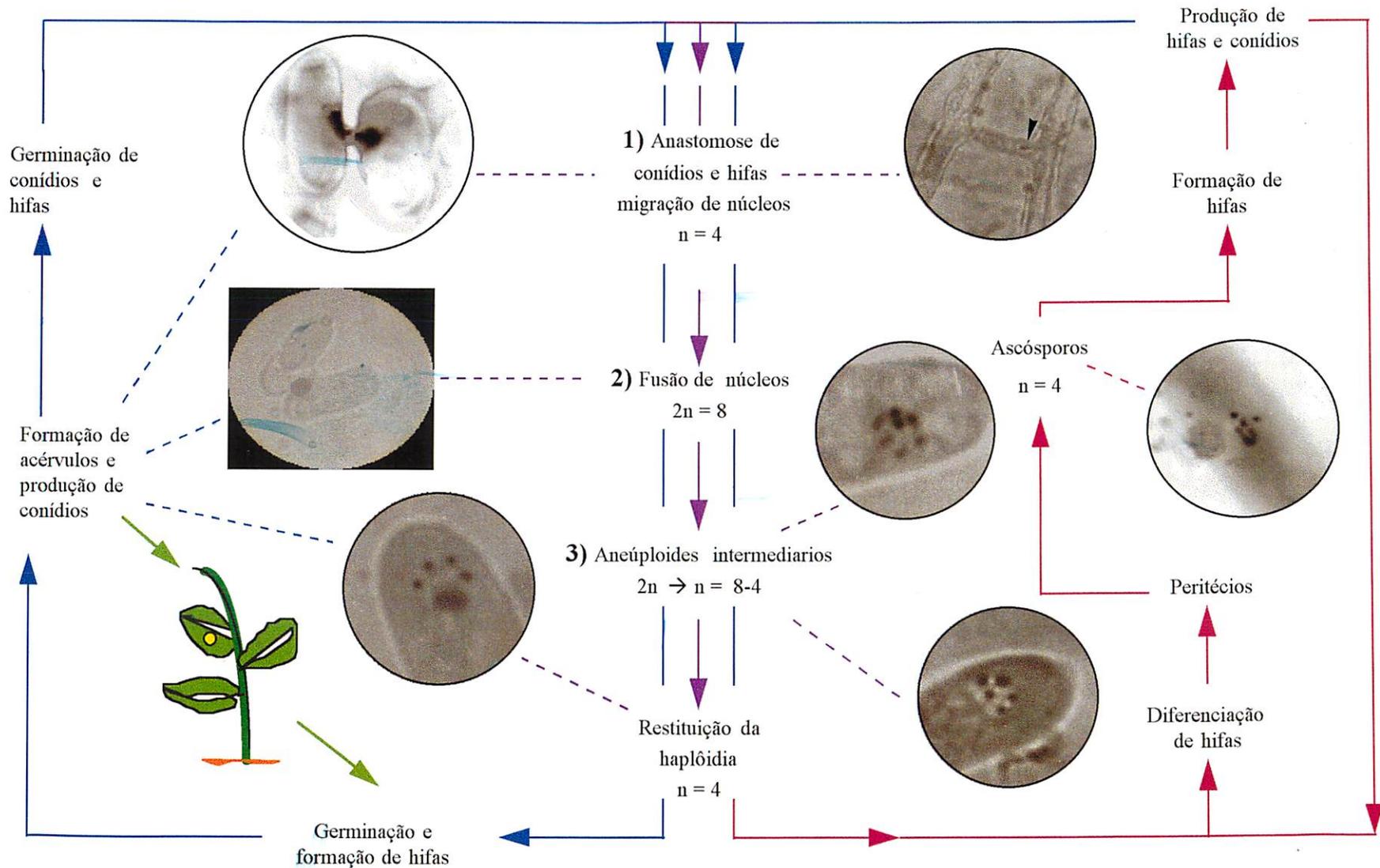


FIGURA 8 Sugestão para o ciclo de vida de *Colletotrichum lindemuthianum*: Ciclo assexual (linha azul); Ciclo sexual (linha vermelha); Ciclo parassexual (linha violeta); Ciclo na natureza (linha verde). UFLA, Lavras, 1997.

ocorre nos conídios livres ou em acérvulos, mais do que nas hifas. Considerando-se que uma grande quantidade de conídios é normalmente produzida pelos fungos, este fenômeno, se ocorrer na natureza, certamente contribuiu para evolução desta espécie (Figura 8).

2) Migração e fusão de núcleos. A produção de conídios nos acérvulos não foi quantificada seguindo um delineamento experimental com repetições, mas considerou-se uma única lâmina em que foi esmagado um acérvulo, e com um mínimo de 10^4 conídios. Nesta lâmina fez-se uma relação quanto aos uninucleados e binucleados de 3:1 quando observado vários campos ao microscópio, sendo aproximadamente a quantidade de binucleados 3×10^3 . Considerando-se ainda que nos conídios observados 9,31% estão em anastomose e 22% destas anastomoses estão com núcleo próximo ao início da anastomose e/ou com formato alongado (sugerindo migração) e utilizando-se como base o mínimo de 10^4 conídios/acérvulo, pode-se acreditar que haveria chances de ocorrer fusão de núcleos. Por outro lado, nos conídios livres avaliados várias vezes foram encontrados núcleos próximos e núcleos que mostravam início de contato (Figuras 6d, 6f, 6g, 6h, e 6i).

Mesmo que estes cálculos possam ser hipotéticos, a evidência citogenética de núcleos diplóides não deixa dúvida de que ocorreu fusão (Figura 5b). Os resultados mostraram cariogamia. Neste sentido dúvidas foram apresentadas nos estudos realizados por Dutta e Garber (1960) em *C. lagenarium* e Bos (1985) em *C. lindemuthianum*, que não tiveram certeza de estar ocorrendo fusão de núcleos nos heterocários encontrados, Medeiros (1988) que descartou a ocorrência do ciclo parassexual, por não ter encontrado binucleados, nem passagem de núcleos entre anastomoses de *C. gloeosporioides*, isolado de vários hospedeiros. Os núcleos com 16 cromossomos encontrados no isolado 1013, poderiam ser núcleos diplóides no início de uma

anáfase, houve separação dos cromossomos e foram contados ao mesmo tempo os dois complementos cromossômicos.

Certamente, as evidências mostram as migrações e as possibilidades de fusão. Esser e Kuenen (1967) consideram que núcleos geneticamente idênticos também podem fundir-se e sofrer recombinação mitótica e reduzir-se até a condição haplóide. Segundo estes autores, isto não tem um efeito genético na variabilidade. A heterocariose seria essencial para uma eficiência genética do ciclo parassexual. A este respeito a heterocariose corresponde ao heterozigoto na reprodução sexual (Esser e Kuenen, 1967).

3) Aneuploidização. Para os números de cromossomos observados na Figura 5a e 5b (maior ou menor do que 4-6), seria difícil acreditar que fosse devido a um polimorfismo cromossômico, já que as frequências encontradas são muito baixas, indicando que sejam provavelmente mais um resultado de um processo de aneuploidização (Figura 8).

O núcleo diplóide é reduzido para a condição haplóide numa frequência relativamente constante de 10^3 /divisão nuclear no ciclo parassexual, segundo Käfer (1961; citado por Esser e Kuenen, 1967) e durante este processo ocorrem vários graus de aneuplóides, que não são derivados da meiose. No entanto, utilizar as frequências citadas na literatura, para fazer comparações paralelas aos resultados apresentados neste trabalho, se torna difícil, já que nas lâminas para a contagem do número de cromossomos, muitos conídios são visualizados, mas não sendo possível a contagem dos cromossomos com facilidade, eles não foram considerados na contagem final de conídios vistos. Pode-se dizer que no mínimo foram vistos 1 milhão de conídios neste trabalho, mas o número deles anotados na avaliação é muito menor, porque restringe-se aos núcleos nitidamente visíveis. Por outro lado, mesmo a contribuição que a meiose possa ter dado à

variação no número de cromossomos na fase mitospórica (ciclo assexual), foi encontrada variação numérica num isolado (1002) que não apresentou o ciclo sexual (fase meiospórica) nas condições de laboratório utilizadas neste trabalho.

Na mitose poucas imagens com características típicas de anáfase foram encontradas, o que poderia sugerir que esta fase ocorre de forma muito rápida ou que a segregação cromossômica ocorreu de forma assincrônica. O assincronismo poderia levar a mais de 4 cromossomos e, explicações parecidas têm sido dada por outros autores (Giatgong e Frederiksen, 1969). No entanto, se algumas metáfases fossem na verdade anáfases assincrônicas, é preciso levar em consideração a provável ocorrência de cromossomos atrasados, os quais contribuiriam para a formação de aneuplóides. Portanto, causando polimorfismo cromossômico ou mais provavelmente, sendo um processo de aneuploidização de diplóides previamente formados. Guerra (1985) descreve o processo de aneuploidização em fungos, exatamente relacionado a anáfases com atrasos de cromossomos.

Desta forma, restitui-se a condição haplóide de $n = 4$, com possibilidades de serem encontrados núcleos com 5 e 6 cromossomos, pelos mecanismos previamente discutidos.

3.5 Conclusões

Em *C. lindemuthianum* ocorrem três fenômenos, demonstrados citologicamente, que se constituem em potencial de variação genética:

- 1) troca de material citoplasmático e genético entre conídios;

- 2) polimorfismo cromossômico numérico de 4-6 cromossomos nos núcleos dos conídios;
- 3) ciclo parassexual de forma rápida, onde o diplóide se mantém instável.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos Capítulos 2 e 3 mostraram que *Colletotrichum lindemuthianum* tem potencial para aumentar a sua variabilidade genética através do ciclo sexual e por parassexualidade. Por outro lado, a troca de material nuclear entre anastomoses e o polimorfismo cromossômico, por si só, constituem fontes de variação. Desta forma, reunindo-se os resultados, sugere-se um ciclo de vida (Figura 8) mais completo para esta espécie.

Finalmente considera-se que é possível estender experimentos para identificar a nível molecular as características dos micronúcleos, a passagem destes e o controle destes na participação dos fenômenos descritos no presente trabalho. Assim como, realizar a nível de campo, testes paralelos de variabilidade quanto à patogenicidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ASHTON, M.L.; MOENS, P.B. Light and electron microscopy of conjugation in the yeast, *Schizosaccharomyces octosporus*. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v.28, n.9, p.1059-1077, Sept. 1982.
- AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogénicos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v.2, n.1, p.3-15, abr. 1976.
- AZEVEDO, J.L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S.O. (cord.). **Genética molecular e de microrganismos**. Piracicaba: Manole, 1987. p.393-408.
- BAGAGLI, E. Parassexualidade e preservação de *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Trichoderma pseudokoningii* (Rifai). Piracicaba: ESALQ, 1992. 142p. (Tese-Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- BAILEY, J.A.; NASH, C.; MORGAN, L.W.; O'CONNELL, R.J. TEBEEST, D.O. Molecular taxonomy of *Colletotrichum* species causing anthracnose on the Malvaceae. **Phytopathology**, St. Paul, v.86, n.10, p.1076-1083, Oct.1996.
- BAKER, B.S. CARPENTER, A.T.; ESPOSITO, M.S. ESPOSITO, R.E.; SANDLER, L. The genetic control of meiosis. **Annual Review of Genetic**, Palo Alto, v.10, p.53-134, 1976.
- BALARDIN, R.S. Identificação de raças fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* no Rio Grande do Sul - Brasil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.22, n.1, p.50-53, mar. 1997.
- BASAVARIAH, A.; MURTHY, T.C. Cytomixis in pollen cells of *Urochloa panicoides* p. Beauv. (Poaceae). **Cytologia**, Tokio, v.52, p.69-74, 1987.
- BATISTA, U.G.; CHAVES, G.M. Patogenicidade de culturas monoascosporicas de cruzamento entre racas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.7, n.2, p.285-293, jun. 1982.
- BOS, C.J **Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi**, Wageningen: WAU, 1985. 156p. (Thesis).

- BRADLEY, S.G. Parasexual phenomena in microorganisms. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.16, p.35-52, 1962.
- BROOKER, N., LESLIE, J.; DICKMAN, M. Nitrate Non-Utilizing Mutants of *Colletotrichum* and their use in studies of vegetative compatibility and genetic relatedness. **Phytopathology**, St.Paul, v.81, n.6, p.672-77, June 1991.
- BROWN, W.V.; BERTKE, E.M. **Citología**. Barcelona: Omega , 1979. 529 p.
- BRYSON, R.J.; CATEN, C.E.; HOLLOMON, D.W.; BAILEY, J.A. Sexuality and genetics of *Colletotrichum* In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p.27-46.
- BYERS, B.; GOETSCH, L. Electron microscopic observations on the meiotic karyotype of diploid and tetraploid *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceeding of the National Academy of Sciences of The United States of America**, Washington, v.72, n.12, p. 5056-5060, 1975.
- CAMARGO, L. Mecanismos de variabilidade genética de agentes fitopatogênicos. In: BERGAMIN F., A. KIMATI, H. AMORIM, L. (eds.). **Manual de fitopatologia**. 3. ed. São Paulo: Ceres, 1995. p.455-469.
- CARVALHO, C.R. **Desenvolvimento de tecnologia citogenética em milho (*Zea mays* L.)**. Viçosa: UFV, 1995. 127p. (Tese-Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- CHILTON, S.J.P.; LUCAS, G.B.; EDGERTON, C.W. Genetics of *Glomerella*. III. Crosses with conidial strains. **American Journal of Botany**, Columbus, v.32, p.549-554, 1945.
- CHILTON, S.J.P.; WHEELER, H.E. Genetics of *Glomerella*. VI. Linkage. **American Journal of Botany**, Columbus, v.36, p.270-273, 1949a.
- CHILTON, S.J.P.; WHEELER, H.E. Genetics of *Glomerella*. VII. Mutation and segregation in Plus cultures. **American Journal of Botany**, Columbus, v.36, p.717-721, 1949b.
- CISAR, C.R.; SPIEGEL, C.R.; TEBEESTE, D.O.; TROUT, C. Evidence for mating between isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* with different host specificities. **Flavour and Fragrance Journal**, Chinchester, v.25, n.4, p. 330-335, 1994.
- DAVIS, R.D.; BOLAND, R.M.; HOWITT, C.J. Colony descriptions, conidium morfology, and the effect of temperature on colony growth of *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Stylosanthes* spp. growing in several countries. **Mycological Research**, Cambridge, v.92, n.2, p. 128-134, 1992.

- DUTTA, S.K.; GARBER, E.D. Genetics of phitopathogenic fungi III. An attempt to demonstrate the parasexual cycle in *Colletotrichum lagenarium*. **Botanical Gazette**, Chicago, v.122,p.118-121, 1960.
- EDGERTON, C. W. Plus and minus in an Ascomycete. **Science**, Washington, v.35, p.151, 1912.
- EDGERTON, C.W. Plus and minus in the genus *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.1, p.244-254, 1914.
- ESSER, K.; KUENEN, R. **Genetics of fungi**. Heidelberg: Springer-Verlag, 1967. 499p.
- FINCHAM, J.R.S., DAY, P.R.; RADFORD, A. **Fungal genetics**. Berkeley: University of California Press, 1979. 611p.
- FROST, R.R. Seta formation in *Colletotrichum* spp. **Nature**, London, v. 201, n.4920, p. 730-731, Feb. 1964.
- GHOSH, B.K. Introduction to the ultrastructure of fungi, In: LASKIN, A.I.; LECHEVALIER, H.A. (eds.). **Handbook of microbiology**. 2. ed. West Palm Beach: C.R.C. Press, 1973. v.2, p.11-60.
- GIATGONG, P.; FREDERIKSEN, R.A. Pathogenic variability and citology of monoconidial subcultures of *Piricularia oryzae*. **Phytopathology**, St. Paul, v.59, n.8, p.1152-1157, Aug. 1969.
- GIL, V.F.; BAILEY, J.; O'CONNELL, R.; SHERIFF, C. Morphological and cellular characterization of *Colletotrichum* isolates obtained from *Phaseolus vulgaris*, *Vigna radiata* and *Vigna unguiculata*. **Fitopatologia Colombiana**, v.18, n.1/2, p. 42-52, 1994.
- GOODAY, G.W. The dynamics of hyphal growth. **Mycological Research**, Cambridge, v.99, n.4, p.385-394, Apr. 1995.
- GRIFFIN, D.H. **Fungal physiology**. New York: John Wiley & Sons, 1981. 383p.
- GRIFFITHS, A.J.F. Natural plasmids of filamentous fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.4, p.673-685, 1995.
- GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. 142p.
- HASTIE, A.C. The genetics of conidial fungi . In: COLE, G.T.; KENDRICK,B. (eds.). **Biology of conidial fungi**. New York: Academic Press, 1981. v.2, p.511-547.

- HE, C. MASEL, H.M.; IRWIN, J.A.G.; KELEMU, J. MANNERS, J.M. Distribution and relationship of chromosome-specific dispensable DNA sequences in diverse isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Mycological Research**, Cambridge, v.99, n.11, p.1325-1333, Nov. 1995.
- HEAGY, F.C.; ROPER, J.A. Deoxyribonucleic acid content of haploid and diploid *Aspergillus* conidia. **Nature**, London, v.170, p.713-714, 1952.
- HRUSHOVETZ, S.B. Citological studies of ascus development in *Cochiliobolus sativus*, **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.34, p.641-651, 1956.
- HÜTTIG, N. Die sexualität bei *Glomerella lycopersici* Krüger and ihr Vererbung **Biol. Zentralbl**, v.55, p. 74-83, 1935.
- ISAAC, S. **Fungal-Plant Interactions**, London: Chapman & Halls, 1996. 418p.
- JUNQUEIRA, N.T.V. ; CHAVES, G.M.; ZAMBOLIN, L.; ROMEIRO, R . DA S. GASPAROTO, L. Isolamento, cultivo e esporulação de *Microcyclus ulei*, agente etiológico do mal das folhas de seringueira. **Revista Ceres**, Viçosa, v.31, n.177, p.322-331, set. 1984.
- KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v. Scherenk. f.sp. *phaseoli* n.f., fase ascôgena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da E.S.A. "Luiz de Queiroz"**, Piracicaba, v.27, p.411-437, 1970.
- KISTLER, H.C.; MIAO, V.P. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v.30, p.131-152, 1992.
- KLEIN, S. Choose your partner: Chromosome pairing in yeast meiosis. **BioEssays**, Cambridge, v.16, n.12, p. 869-871, 1994.
- KNOX-DAVIES, P.S.; DICKSON, J.G. Cytology of *Helminthosporium turcicum* and its ascigerous stage, *Trichometasphaeria terica*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.47, p.328-329, 1960.
- KOTLYAREVSKII, D.I.; LEVITES, E.U. Detection of parasexual process in the fungus *verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas by means of isoenzymes. **Doklady Akademii Nauk**, Moscow, v.319, n.3, p. 743-744, 1991.
- KRUGNER, L.T.; BACCHIL, L.M.A. Fungos. In: BERGAMIN F., A; KIMATI, H. AMORIM, L.(eds.). **Manual de fitopatología**. 3. ed., São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v.1, p.46-95.
- LAI, E.; BIRREN, B.W.; CLARK, S.M.; SIMON, M.I.; HOOD, L. Pulsed field gel electrophoresis. **BioTechniques**, Natick, v.7, n.1, p.34-42, 1989.

- LIYANAGE, H.D.; MCMILLAN, JR.; KISTLER, H.C. Two genetically distinct populations of *Colletotrichum gloeosporioides* from citrus. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.11, p.1371-1376, Nov. 1992.
- LUCAS, G.B. Genetics of *Glomerella*. IV. Nuclear phenomena in the ascus. **American Journal of Botany**, Columbus, v.33, p.802-806, 1946.
- MAHE, A.; GRISVARD, J.; DRON, M. Two avirulent races of *Colletotrichum lindemuthianum* trigger different time courses of plant defense reactions in beans. **Molecular-Plant Microbe Interactions**, St. Paul, v.6, n.2, p.413-428, 1993.
- MANANDHAR, J.B.; HARTMAN, G.L.; WANG, T.C. Conidial germination and appressorial formation of *Colletotrichum capsici* and *C. gloeosporioides* isolates from pepper. **Plant Disease**, St. Paul, v.79, n.4, p.361-366, 1995.
- MANNERS, J.; BAMPTON, S.S. Fusion of uredospore germ tubes in *Puccinia graminis*. **Nature**, London, v.179, p.483-484, 1957.
- MANNERS, J.M.; MASEL, A.; BRAITHWAITE, K.S.; IRWIN, J.A.G. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic of the Tropical Pasture Legume *Stylosanthes*, In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*, Wallingford: C.A.B. International, 1992. p.250-268
- MASEL, A.M.; BRAITHWAITE, K.; IRWIN, J.; MANNERS, J.M. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v.18, p.81-86, 1990.
- MASEL, A.M.; HE, C.; POPLAWSKI, A.M.; IRWIN J., A.G.; MANNERS, J.M. Molecular evidence for chromosome transfer between biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.95, n.5, p.339-348, 1996.
- MASEL, A.M.; IRWIN J., A.G.; MANNERS, J.M. Mini-chromosomes of *Colletotricgum* spp. infecting several host species in various countries. **Mycological Research**, Cambridge, v.97, n.7, p.852-856, July 1993a.
- MASEL, A.M.; IRWIN J.,A.G.; MANNERS, J.M. DNA addition or deletion is associated with a major karyotype polymorphism in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.237, p.73-80, 1993b.
- MASEL, A.M.; MANNERS, J.M. Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. **Current Genetics**, Berlin, v.18, p.81-86, 1990.
- MCCONKEY, G.A.; WATERS, A.; MCCUTHAN, T.F. The generation of genetic diversity in Malaria parasites. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.44, p. 479-498, 1990.

- MCCULLY, E.K.; KATHLEEN, E.; ROBINOW, C.F. Mitoses in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: a comparative study with light and electron microscopy. **Journal Cell Science**, Cambridge, v.9, n.2, p.475-507, Sept. 1971.
- MCDONALD, B.A.; MARTINEZ, J.P. Chromosome length polymorphisms in a *Septoria tritici* population. **Current Genetics**, Berlim, v.19, p.265-271, 1991.
- MCGAHEN, J.W.; WHEELER, H.E. Genetics of *Glomerella*. IX. Perithecial development and plasmogamy. **American Journal of Botany**, Columbus, v.38, p.610-617, 1951.
- MEDEIROS, J. Aspectos da Biologia de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spaulde. & Scherenk (Forma amórfica *Colletotrichum gloesporioides* Penz). Porto Alegre: UFRGS, 1988. 80p. (Dissertação-Mestrado em Botânica).
- MENDES-COSTA, M.C. Genetics of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* I. Sexual compatibility. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.19 n.3; C.230, p.350, set. 1996. (Suplemento do Congresso Nacional de Genética, 42, Caxambu, 1996).
- MENDES-COSTA, M.C.; DAVIDE C., L.; ROCA M., M.G. Citologia de *Colletotrichum lindemuthium* f.sp. *phaseoli* em cultura. In: REUNIÃO DE GENÉTICA DE MICRORGANISMOS, Piracicaba, 1995. **Anais ...**, 20, Piracicaba: ESALQ, 1995. v.20, p.82. (Resumo).
- MERCER, P.C.; WOOD, R.K.; GREENWOOD, A.D. Ultrastructure of the parasitism of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v.4, p.203-214, 1975.
- MIAO, V.P.; COVERT, S.F. VANETTEN, H.D. A fungal gene for antibiotic resistance on a dispensable ("B") chromosome. **Science**, Washington, v.254, n. 5039, p.1773-1776, Dec.1991.
- MILLS, D.; MCCLUSKEY, K. Electrophoretic karyotypes of fungi: the new cytology. **Molecular Plant-Microbe Interaction**, St. Paul, v.3, n.6, p.351-357, 1990.
- MOENS, P.B; PEKINS, I.O. Chromosome number of a small protist: accurate determination. **Science**, Washington, v.166, n.3910, p.1289-1291, Dec. 1969.
- MOULD, M.J.; BOLAND, G.J. ROBB, J. Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii*-*Medicago sativa* pathosystem. I. Pre-penetration events. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.38, p.179-194, 1991a.
- MOULD, M.J.; BOLAND, G.J. ROBB, J. Ultrastructure of the *Colletotrichum trifolii*-*Medicago sativa* pathosystem. II. Post-penetration events. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v.38, p.195-210, 1991b.

- O'CONNELL J., R. J.; BAILEY, J. A.; RICHMOND, D.V. Cytology and physiology of infection of *Phaseolus vulgaris* by *Colletotrichum lindemuthianum*. **Physiological Plant Pathology**, London, v.27, p.75-98, 1985.
- OLIVEIRA DE, M. Mecanismos de produção de pólen não reduzido em híbridos de dihaplóides de *Solanum tuberosum* L. x *Solanum chacoense* Bitt. Lavras: UFLA, 1994. 66 p. (Dissertação-Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas).
- OMARA, M.K. Cytomixis in *Lolium perenne*. **Chromosoma**, Berlim, v.55, p. 267-271 , 1976
- PONTECORVO, G. The genetics of *Aspergillus nidulans*. **Advances in Genetics**, New York, v.5, p.141-238, 1953.
- PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.10, p.393-400, 1956.
- PONTECORVO, G.; GLOOR, E.T.; FORBES, E. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Genetic**, Bangalore, v.52, p. 226- 237, 1954.
- PONTECORVO, G.; ROPER, J.A. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. **Journal General Microbiology**, SpencersWood, v.10, p.7-8, 1952.
- RAVA, C.A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.18, n.3, p.388-391, set. 1993.
- RAVA, A.C.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterizacao de patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regioes produtoras de feijoeiro comun. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.19, n.2, p.167-172, jun. 1994.
- RAVA, A.C.; SARTORATO, A. Antracnose. In: RAVA, A.C.; SARTORATO, A. (ed.) **Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.17-40.
- ROANE, C.W. A method of preparing fungi for cytological studies. **Phytopathology**, St. Paul, v.42, .p.480, 1952. (Abstract)
- ROBINOW, C.F. The preparation of yeast for light microscpy. In: PRESCOT, T.; DAVID, M. (eds.). **Methods in cell biology**. New York: Academic Press, 1975. v.11, p.2-21.
- ROBINOW, C.F. Nuclear behavior in conidial fungi In: COLE, G.T.; KENDRICK, B. **Biology of Conidial fungi**, New York: Academic Press, 1981. v.2, p.357-393.

- ROBINOW, C.F.; CATEN, C.E. Mitosis in *Aspergillus nidulans*. **Journal of Cell Science**, Washington, v.5, n.2, p.403-431, Sept. 1969.
- RODENTIER, H.A.; HURD-KARBER, A.M. Evidence of fusion bodies from urediospore germ tubes of cereal rusts on nutrient-solution agar. **Phytopathology**, St. Paul, v.37, n.10, p.744-756, Oct. 1947.
- RODRIGUES, E.C. **Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Hemicola sp.*** ESALQ: Piracicaba, 1987. 152 p. (Tese Mestrado-Microbiologia Agrícola).
- RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S. Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (eds.) ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p.47-66.
- RUSTCHENKO-BULGAC, E.P.; SHERMAN, F.; HICKS, J.B. Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means of genetic variation of *Candida albicans*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.172, p. 1276-1283, 1990.
- SAMUELS, G.J.; SEIFERT, K.A. The impact of molecular characters on systematics of filamentous ascomycetes. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v.33, p.37-67, 1995.
- SCHREIBER, L.R.; GREEN JR, R.J. Anastomosis in *Verticillium albo-atrum* in soil. **Phytopathology**, St. Paul, v.56, p.1110-1111, 1966.
- SHARMA, K.A.; SHARMA, A. **Chromosome techniques: a manual**. Chur: Hardwood Academic, 1994. 367 p.
- SHERRIF, C.; WHELAN, M.J.; ARNOLD, G.M.; LAFAY, J.F.; BRIGOO, Y.; BAILEY, J.A. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *Colletotrichum*. **Experimental Mycology**, San Diego, v.18, n.2, p.121-138, June, 1994.
- SKIRVEN, R. Natural and induced variation in tissue culture. **Euphytica**, Dordrecht, v. 27, p.241-226, 1978.
- STEEL, R.G.; TORRIE, J.H. **Principles and procedures of statistics**. 2. ed. New York: McGraw-Hill, 1980. 781p.
- SUTTON, B.C. The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**, Wallingford: C.A.B. International, 1992. p.1-26.
- TABER, W.A.; TABER, R.A. The ascomycetes. In: LASKIN, A.I.; LECHEALIER, H.A. (eds.). **Handbook of microbiology**. ed. cond. Cleveland: CRC Press, 1974. 328p.

- TALBOT, N.J.; OLIVER, R.R.; CODDINGTON, A. Pulsed field gel electrophoresis reveals chromosome length differences between strains of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*). **Molecular and General Genetics**, Berlin, v.229, n.4, p.267-272, 1991.
- TEBEEST, D.; SHILLING, C.W.; RILEY, L.H.; WEIDEMANN, G. J. The number of nuclei in spores of three species of *Colletotrichum*. **Mycologia**, New York, v.81, n.1, p.147-149, 1989.
- TU, J.C. *Colletotrichum lindemuthianum* on Bean: Population dynamics of the pathogen and breeding resistance. In: In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C.A.B. International, 1992. p.203-224.
- UECKER, F.A. Ontogeny of the ascoma of *Glomerella cingulata*. **Mycologia**, New York, v.86, n.1, p.82-88, Jan. 1994.
- VAN-DYKE, C.G.; MIMS, C.W. Ultrastructura of conidia, conidium, germination and appressorium development in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum truncatum*. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.69, n.11, p.2455-2467, Nov. 1991.
- WANG, S.; HANG, A. TSUCHIYA, T. Chromosome studies of callus tissues and regenerated plants from an unfertilized ovule culture of sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). **Journal of Genetic and Breeding**, Roma, v.45, n.3, 161-168, July 1991.
- WATSON, I. A. Further studies on the production of new races from mixtures of races of *Puccinia graminis* var. *tritici* on wheat seedlings. **Phytopathology**, St. Paul, v.57, n.8, p.510-512, Aug. 1957.
- WELLS, K. Light and electron microscopic studies of *Ascobolus stercorarius*. I. Nuclear divisions in the ascus. **Mycologia**, New York, v.62, p.761-790, 1970.
- WHEELER, H.E. Genetics of *Glomerella*. VIII. A genetic basis for the occurrence of Minus mutants. **American Journal of Botany**, Columbus, v.37, n.4, p.304-312, Apr.1950.
- WHEELER, H.E. Genetics and evolution of heterotalismo in *Glomerella*. **Phytopathology**, St. Paul, v.44, n.7, p.342-345, July 1954.
- WHEELER, H.E. Linkage groups in *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.43, n.1, p.869-972, 1956.
- WHEELER, H.E.; DRIVER, C.H. Genetics and cytology of a mutant, dwarf-spored *Glomerella*. **American Journal of Botany**, Columbus, v.40, p.694-702, 1953.
- WHEELER, H.E.; MCGAHEN, J.W. Genetics of *Glomerella*.X. Genes affecting sexual reproduction. **American Journal of Botany**, Columbus, v.39, p.110-119, 1952.

- WHEELER, H.E.; OLIVE, L.S.; ERNEST, C.T. EDGERTON, C.W. Genetics of *Glomerella*. V. Crozier and ascus development. **American Journal of Botany**, Columbus, v.35, p.722-728, 1948.
- WICKES, B.L.; GOLIN, J.E.; KWON-CHUNG, K.J. Chromosomal rearrangement in *Candida stellatoidea* results in a positive effects on phenotype. **Infection and Immunity**, Washington, v.59, p.1762-71, 1991.
- WILCOXSON, R.D.; TUIITE, J.F.; TUCKER, S. Urediospore germ tube fusions in *Puccinia graminis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.48, p.358-361, 1958.
- YEOMAN, M.M.; FORCHE, E. Cell proliferation and growth in callus cultures. In: VASIL, I.K. (ed.). **Perspectives in plant cell and tissue culture**, New York: Academic Press, 1980. p.1-24.
- ZICKLER, D. Division spindle and centrosomal plaques during mitosis and meiosis sin some *Ascomycetes*. **Chromosome**, Berlim, v.30, p.287-304, 1970.
- ZOLAN, M.E. Chromosome-length polymorphism in fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.4, p.686-698, 1995.

APÊNDICE

**TABELA 1A ANAVA do número de cromossomos na meiose dos isolados 531 e 1013. UFLA,
Lavras, 1997**

Causas de variação	GL	SQ	QM	F
Isolados (entre)	1	0,0037	0,0037	0,09 ^{ns}
Dentro	68	2,8974	0,0426	
Total	89	2,9011		

CV: 9,88 %