



UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS

**RECOMBINAÇÃO GENÉTICA EM *Colletotrichum
lindemuthianum* POR MEIO DE ANASTOMOSES ENTRE
CONÍDIOS**

MARÍA GABRIELA ROCA MAGALLANES

2002

52987

MFN-37507

MARÍA GABRIELA ROCA MAGALLANES

RECOMBINAÇÃO GENÉTICA EM *Colletotrichum lindemuthianum* POR MEIO DE ANASTOMOSES ENTRE CONÍDIOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

Orientadora

Profa. Lisete Chamma Davide

**LAVRAS
MINAS GERAIS - BRASIL**

2002



Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA

Roca Magallanes, María Gabriela

Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios / María Gabriela Roca Magallanes . -- Lavras : UFLA, 2002.

138 p. : il.

Orientadora: Lisete Chamma Davide.

Tese (Doutorado) -- UFLA.

Bibliografia.

1. Ciclo parassexual. 2. Microscopia. 3. Citogenética. 4. Genética de microrganismo. 5. *Glomerella*. 6. Antracnose. 7. Reprodução assexuada. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-632.44048762

MARÍA GABRIELA ROCA MAGALLANES

RECOMBINAÇÃO GENÉTICA EM *Colletotrichum lindemuthianum* POR MEIO DE ANASTOMOSES ENTRE CONÍDIOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Agronomia, área de concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do título de "Doutor".

APROVADA em 22 de Fevereiro de 2002

Profa. Elaine Aparecida de Souza

UFLA

Prof. Ludwig Heinrich Pfenning

UFLA

Profa. Maria Helena Pelegrinelli Fungaro

UEL

Profa. Marisa Viera de Queiroz

UFV



Prof^o. Lisete Chamma Davide

UFLA

(Orientadora)

LAVRAS

MINAS GERAIS - BRASIL

*Aos meus pais, Victor Manuel e Carmen Teresa,
com todo meu amor e agradecimento.*

DEDICO

Aos meus irmãos, Victor Rafael e Maria Fabiola

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Biologia, pela oportunidade concedida para realização do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro concedido para a realização do curso.

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa em Microscopia Eletrônica Aplicada à Pesquisa Agropecuária (NAP/MEPA), ESALQ-USP, pela oportunidade de utilização do microscópio eletrônico de varredura e demais equipamentos para realização da tese.

À Universidade de Bath (Bath-UK), ao Departamento de Biologia e Bioquímica e ao Prof. Alan E. Whcals, pelo acolhimento por um ano para realização de experimentos e excelente orientação.

À Profra. Antonia dos Reis Figueira (Departamento de Fitopatologia-UFLA e FAPEMIG) e Dr. E.W. Kitajima (ESALQ-USP), pela colaboração para utilização dos microscópios eletrônicos de transmissão e varredura, respectivamente.

À Dra. Maria das Graças Ongarelli (USP-ESALQ), pela ajuda e colaboração para preparação de amostras e utilização do microscópio eletrônico de transmissão e de varredura.

À Dra. Maria Cristina Mendes-Costa, por haver me iniciado nesta fascinante área e permitido a mim trabalhar com ela.

Às professoras Lisete Chamma Davide e Rosane Schwan pela orientação, amizade, incentivo, mostra de confiança e colaboração.

Ao Paul Dean e Dr. Richard Adams, pelo auxílio e colaboração no microscópio confocal, reagentes e análises de imagens, na Universidade de Bath (Bath-UK).

Ao Dr. Bernard Dumas (Universidade de Toulouse-França), por permitir e conceder o isolado H2 de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Ao Dr. Pedro Sanchez (Universidade de Bath), pelo plasmídeo e demais materiais, assim como pelas discussões para a condução de alguns experimentos.

Aos professores da UFLA, Magno Patto Ramalho, João Bosco dos Santos, Ludwig Pfenning, Mário Lucio Resende, Custódio Donizeti dos Santos, Giovana Torres, João Cândido de Souza, Cesar E. B. Pinto e Eustáquio Souza Dias; e da Universidade de Bath, Richard Adams e Richard Cooper, por inúmeras sugestões.

À professoras Maria Helena P. Fungaro (UEL), Marisa de Queiroz (UFV) e Elaine Aparecida de Souza (UFLA), pelas sugestões durante a discussão da tese.

A Pedro Nürnberg e Araxi Urrutia, pelas valiosas discussões, ensinamentos, correções, sugestões e ajudas ao longo do curso. A Fernando Barcellos e Veronica Fuentes, pelas sugestões e discussões para analisar os resultados.

Aos estagiários Ricardo Rojas M., Robert Cragg e Livia Maria Chamma Davide, pela ajuda nas atividades realizadas em alguns dos experimentos.

Às pesquisadoras Dra. Hélia Alves e Dra. Angela Abreu, pela assistência durante as inoculações e plantios.

Às secretárias Elaine, Zélia e Rafaela, pela atenção em todos estes anos.

Aos colegas e amigos dos laboratórios Rose, Sandro, Juscélio, Adão, Paschalis, Paul, Jane, José, Claudia, Renata, Aramalia, Ana Hortência, Cidinha, Juliano, Lamartine e Alcimara.

Às amigas Vânia Helena e Claudia Regina, pela convivência, meu mais sincero agradecimento.

Aos amigos Amalia F., Edvard F., Giovanna V., Neila C., Adriana R. e Eduardo L., pela paciência e, estando longe ou perto, por me darem força nestes anos.

Às famílias Soligo, Davide e Valli Braile, pela paciência e solidariedade ao longo do meu curso.

À minha família, pelo apoio, incentivo, dedicação, compreensão e amor.

Ao Adelar Jeferson Soligo, pelo seu caráter, sua solidez e confiança durante esses anos.

A todos aqueles que, estando perto de mim, acabaram por contribuir de alguma forma para a realização deste trabalho. A todos, o meu mais sincero agradecimento.

SUMÁRIO

	Página
Resumo	i
Abstract	ii
1 Introdução geral	1
2 Referencial teórico	2
2.1 O Gênero <i>Colletotrichum</i> (<i>Glomerella cingulata</i>)	2
2.1.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	2
2.1.2 <i>Colletotrichum gossypii</i>	5
2.2 Fontes de variação genética	6
2.2.1 Reprodução sexual em <i>C. lindemuthianum</i>	6
2.2.2 Polimorfismo cromossômico no gênero <i>Colletotrichum</i>	7
2.2.3 Anastomoses entre conídios em <i>C. lindemuthianum</i>	8
2.2.4 Ciclo Parassexual	10
2.2.5 Variações do ciclo parassexual	12
2.2.5.1 Parameiose	12
2.2.5.2 Outras variações	13
2.3 Técnicas utilizadas para estudo da variabilidade genética	14
2.3.1 Protoplastos	14
2.3.2 PCR (<i>Polymerase chain reaction</i>)	15
2.3.3 Microscopia eletrônica	16
2.3.4 Microscopia de fluorescência e laser	17
3 Referências bibliográficas	18
CAPÍTULO 1: Aspectos estruturais da esporulação do agente causal da antracnose no feijoeiro	29
Resumo	30
Abstract	31

1.1. Introdução	32
1.2. Material e métodos	33
1.2.1 Amostragem	33
1.2.1.1 Amostras do substrato natural	33
1.2.1.2 Isolados	33
1.2.2 Definição das raças fisiológicas	34
1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	35
1.3 Resultados	35
1.3.1 Amostras do substrato natural	35
1.3.2 Isolados	36
1.4 Discussão	40
1.5 Conclusão	45
1.6 Referências bibliográficas	45
CAPÍTULO 2: Citologia das anastomoses entre conídios do fungo fitopatogênico <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	49
Resumo	50
Abstract	51
2.1 Introdução	52
2.2. Material e metodos	54
2.2.1 Isolados e meios de cultura	54
2.2.2 Frequência das anastomoses	54
2.2.3 Características das anastomoses	55
2.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	55
2.2.3.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	56
2.2.4 Biologia celular das anastomoses entre conídios	57
2.2.4.1 Microscopia de fluorescência	57
2.2.4.2 Microscopia confocal de varredura a laser (LSCM)	57
2.3. Resultados e discussão	58

2.4. Conclusões	67
2.5. Referências bibliográficas	68
CAPÍTULO 3: Transferência horizontal entre duas espécies de	
<i>Colletotrichum</i>	71
Resumo	72
Abstract	73
3.1 Introdução	74
3.2 Material e métodos	75
3.2.1 Meios de cultura e isolados	75
3.2.2 Definição das raças fisiológicas	76
3.2.3 Número de núcleos nos conídios	76
3.2.4 Análises genéticas e PCR	77
3.3 Resultados	79
3.4 Discussão	85
3.5 Conclusão	88
3.6 Referências bibliográficas	88
CAPÍTULO 4: Dinâmica e características nucleares das	
anastomoses entre conídios de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	92
Resumo	93
Abstract	94
4.1 Introdução	95
4.2 Material e métodos	96
4.2.1 Isolados de <i>C. lindemuthianum</i> e meios de cultura	96
4.2.2 Definição das raças fisiológicas	97
4.2.3 Dinâmica do núcleo	97
4.2.4 Tamanho e distribuição dos núcleos	99
4.2.5 Digestão enzimática das paredes	100
4.2.6 Microculturas	101

4.2.4 Tamanho e distribuição dos núcleos	99
4.2.5 Digestão enzimática das paredes	100
4.2.6 Microculturas	101
4.2.7 Encontros entre diferentes isolados	101
4.2.8 Ensaio com a mucilagem	102
4.2.9 Análises genéticas	102
4.3 Resultados	104
4.3.1 Características do complexo de anastomoses entre conídios	104
4.3.2 Cinética da formação das anastomoses	106
4.3.3 Características dos núcleos	112
4.3.4 Posição e número de núcleos nos conídios em anastomoses	117
4.3.5 Genética e desenvolvimento a partir das anastomoses entre conídios	121
4.4 Discussão	123
4.4.1 Reprodução assexual em <i>Colleotrichum lindemuthianum</i>	123
4.4.2 Origem e natureza das anastomoses entre conídios	124
4.4.2.1 Falhas no processo de conidiogênese	124
4.4.2.2 Formação de conídios secundários via microciclo	124
4.4.2.3 Fusão de tubos germinativos	125
4.4.2.4 Formação de conexões citoplasmáticas	126
4.4.3 Dinâmica do núcleo nos conídios	127
4.4.3.1 Conídios livres	127
4.4.3.2 Conídios em anastomoses	129
4.4.4 Troca de material genético e as anastomoses entre conídios	130
4.5 Conclusões	133
4.6 Referências bibliográficas	134

RESUMO

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios. 2002. 138p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

Colletotrichum lindemuthianum, o agente causal da antracnose no feijoeiro, é um fungo com muitas raças fisiológicas que mostra um extensivo polimorfismo cromossômico. A forma sexual não foi encontrada na natureza e os mecanismos que promovem variabilidade genética são desconhecidos. Utilizando microscopia ótica, eletrônica de varredura e transmissão, fluorescência e confocal, foram observadas anastomoses entre conídios. As maiores frequências ocorreram nos primeiros 30 dias do desenvolvimento do acérvulo. Estas foram diferentes do tubo germinativo quanto à forma, frequência e época de ocorrência. Anastomoses múltiplas foram encontradas formando cadeias de conídios, bem como vacúolos e mitocôndrias sendo transferidos pelos tubos de anastomoses. Septos também estavam presentes, ocasionalmente. Os núcleos mostram uma dinâmica intensa e conídios em anastomoses foram encontrados sem núcleos ou multinucleados, sugerindo prováveis fusões, divisões e degenerações. Utilizando uma combinação de micromanipulações para isolar conídios em anastomoses oriundos de cruzamentos, mostrou-se que heterocários foram formados de isolados geneticamente marcados. Foram promovidos cruzamentos entre *C. lindemuthianum* e *C. gossypii* e utilizados marcadores fenotípicos e de PCR para isolar um recombinante. Sugere-se que a recombinação assexual por meio de anastomoses entre conídios seja um dos mecanismos envolvidos para aumentar a variabilidade genética desta espécie.

* Comitê de orientação: Lisete Chamma Davide - UFLA (Professora orientadora), Alan Wheals – Universidade de Bath - UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

ABSTRACT

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Genetic recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* via conidial anastomosis. 2002. 138p. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

Colletotrichum lindemuthianum, the causative agent of bean anthracnose, is a fungal pathogen with a large number of pathogenic races and shows extensive chromosomal variability. No sexual forms have been found so far in nature and the causes of this genetic diversity are unknown. Using light, SEM, TEM, fluorescence and confocal microscopy, anastomoses can be seen between conidia with increasing frequency during the first 30 days of acervulus development. They are different from germ tubes in form, frequency and time of initiation. Multiple anastomoses can occur yielding chains of conidia. Vacuoles and mitochondria can move between conidia but occasional septa can be seen. The nuclei show extensive dynamics with anucleate and multinucleate anastomosed conidia, presumptive fusions, divisions and degenerations. Using a combination of micromanipulation, to isolate anastomosed conidia from crosses, we show that at least heterokaryons form between genetically marked strains. Have been created crosses between *C. lindemuthianum* and *C. gossypii*, and both phenotypic and PCR makers were used to isolate a recombinant. We suggest that asexual recombination *via* conidial anastomoses is one of the causative mechanisms of genetic variability in this species.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Alan Wheals - University of Bath - UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

1 INTRODUÇÃO GERAL

Colletotrichum lindemuthianum (Sacc. & Magn.) Scribner é o agente causal da antracnose no feijoeiro. Trata-se de um fungo fitopatogênico que é estudado freqüentemente na sua forma mitospórica, uma vez que a sua forma meiospórica, conhecida como *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk f. sp. *phaseoli*, nunca foi encontrada na natureza. Por esta razão é definido como um ascomiceto mitospórico.

C. lindemuthianum apresenta diferentes raças fisiológicas que são definidas em função da presença ou ausência de sintomas em cultivares diferenciadoras de feijão. Esse fato tem permitido mostrar que a espécie possui ampla variabilidade genética quando se utilizam, como referência, estas características (Latunde-Dada, 2001). Devido a esta variabilidade questiona-se se ela pode ter sido originada somente por meio de mutação (Sicard *et al.*, 1997; Brygoo *et al.*, 1998). Além disso, como a forma meiospórica ou sexual só foi encontrada em condições de laboratório, existem muitas dúvidas sobre a existência de outros mecanismos que ajudem a explicar essa variabilidade.

Um maior ^{Ítem} número de trabalhos descritivos, citológicos e genéticos desta espécie é necessário, sobretudo no Brasil, onde existem diversos programas de melhoramento do feijoeiro visando à resistência a este patógeno. Sabe-se que não só é importante o conhecimento das diferentes raças que prevalecem nas diferentes regiões do país, como também da existência de mecanismos no patógeno que ajudem a aumentar a variabilidade genética.

Aparentemente, em *C. lindemuthianum* esses mecanismos existem, mas têm sido obtidos como peças soltas num comportamento genético nada claro. Isto posto, o objetivo desse trabalho foi utilizar diferentes técnicas citogenéticas para obter resultados que ajudem a esclarecer, formular e tentar provar várias hipóteses sobre o comportamento e forma de vida deste fungo e, assim, explicar a variabilidade genética encontrada.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Colletotrichum* (*Glomerella cingulata*)

Glomerella cingulata (forma meiospórica, sexual ou teleomórfica – ascomiceto) tem diferentes formas mitospóricas (assexuais ou anamórficas) e há divergências com relação à classificação na categoria específica, entre as diferentes formas mitospóricas do gênero *Colletotrichum* (Arx, 1957; Sutton, 1992; Samuels & Seifert, 1995). *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, somente foi encontrada em condições de laboratório. Por isso, é melhor conhecida na forma mitospórica, como *Colletotrichum lindemuthianum* (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Alguns trabalhos descritivos sobre a formação dos peritécios e ascósporos têm sido realizados para *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* (Kimati & Galli, 1970; Bryson, 1990; Mendes-Costa, 1996; Roca 1997; Roca *et al.*, 2000). Muitas espécies dentro deste gênero (Sutton, 1992) são facilmente diferenciadas pelos vários hospedeiros nos quais causam doenças. Para alguns autores, estes são organismos muito parecidos e mais estudos são necessários (Sutton, 1992). Os trabalhos na área de genética são escassos para algumas espécies dentro do gênero, sendo mais frequentes em outras como *Colletotrichum gloeosporioides* (He *et al.*, 1998; Zhu & Oudemans, 2000) ou *G. cingulata* (Rikkerink *et al.*, 1994; Cisar & TeBeest, 1999).

2.1.1 *Colletotrichum lindemuthianum*

Colletotrichum lindemuthianum se reproduz de forma assexual, produzindo os conídios (esporos assexuais) num corpo de frutificação chamado acérvulo (Taber & Taber, 1974; Sutton, 1992). Os conídios formam massas de cor salmão ou mel no meio de cultura. São hialinos, unicelulares, oblongos e cilíndricos, apresentando as extremidades arredondadas e medindo de 3,5 a

4,5µm x 9,5 a 11,5µm (Sutton, 1992). Em seis isolados brasileiros, Roca (1997) encontrou, como média, um valor de 5,3µm x 13µm em amostras com dez dias de cultivo e com diferenças significativas entre os isolados utilizados.

Nos fungos, de forma geral, a germinação dos conídios está relacionada com o início da atividade metabólica e do desenvolvimento vegetativo (Oshero & May, 2001). Foi mostrado, em algumas espécies do gênero, que a disseminação dos conídios em estado de dormência pode garantir a propagação da espécie. Isso provavelmente, se deve a atuação de agentes inibidores e à proteção oferecida pela mucilagem extracelular na qual os conídios estão envolvidos (Pain *et al.*, 1994; 1996). O passo seguinte é a germinação, quando há a restauração da atividade metabólica e o desenvolvimento vegetativo do fungo.

Diversos trabalhos têm sido realizados sobre a relação patógeno-hospedeiro e revisões completas são encontradas a este respeito (Perfect *et al.*, 1999). Por ocasião da germinação, um conídio de *Colletotrichum* spp. pode emitir um ou mais tubos germinativos, sendo mais freqüentes dois. Estes podem formar apressórios em seus ápices (Mould *et al.*, 1991b; Manandhar *et al.*, 1995; Latunde-Dada, 2001) ou continuar crescendo, formando as hifas e o micélio. De forma mais comum, o tubo germinativo tem origem lateral, perto de uma das extremidades do conídio e pode desenvolver um septo na região mediana do conídio, dividindo-o em duas células uninucleadas (Mould *et al.*, 1991b; Manandhar *et al.*, 1995).

O agente causal da antracnose do feijoeiro apresenta muitas raças fisiológicas, definidas em função da capacidade dos mesmos em causar doença em determinadas cultivares de um mesmo hospedeiro (Kimati & Galli, 1970; Batista & Chaves, 1982; Rava *et al.*, 1993; Mahe *et al.*, 1993; Rava *et al.*, 1994; Perfect *et al.*, 1999). Há também relatos de variabilidade em isolados monospóricos, quando mantidos e cultivados em laboratório (Rodrigues, 1987;

Brooker *et al.*, 1991). Alguns autores acreditam que a extensa variabilidade patogênica existente ajude a quebrar rapidamente a resistência de cultivares (Brygoo *et al.* 1998).

Para Hastie (1981), a mutação é a fonte básica de variação genética e a heterocariose e heteroplasiose conduzem à variação em fungos selvagens. No entanto, alguns trabalhos realizados entre populações de diferentes regiões geográficas mostram que o alto nível de diversidade fenotípica, associado ao alto nível de diversidade genotípica e o baixo desequilíbrio gamético, em algumas regiões da América Central, sustentariam a hipótese de que as populações de *C. lindemuthianum* são compostas, principalmente, de genótipos originados por recombinação (Brygoo *et al.*, 1998). Estes autores também afirmam que esta recombinação deve ser um evento raro, ancestral ou localizado em algumas regiões geográficas somente. As atuais populações epidêmicas aparentemente se reproduzem de forma assexual, sem ter, no entanto, um genótipo predominante único (Brygoo *et al.*, 1998).

A recombinação genética durante o ciclo parassexual obviamente tem valor potencial na biologia de fungos conidiais e de outros fungos (Hastie, 1981). Kistler e Miao (1992) propõem que o polimorfismo cromossômico também deve ser considerado como fonte de variação. Destes mecanismos, em *C. lindemuthianum* foram demonstrados a heterocariose por meio de fusão de protoplastos (Bos, 1985), o polimorfismo cromossômico (Roca, 1997, O'Sullivan *et al.*, 1998) e o rearranjo do genoma (O'Sullivan *et al.*, 1998).

Estudos utilizando transformantes são úteis para auxiliar no entendimento dos mecanismos responsáveis pela criação de variabilidade genética. Porém, existem poucos trabalhos com isolados de *C. lindemuthianum* geneticamente modificados (Rodriguez & Yoder, 1991; Dumas *et al.*, 1999).

O isolado de *C. lindemuthianum*, H2, geneticamente modificado (Dumas *et al.*, 1999), foi obtido utilizando-se como vetor para transformação um sistema

contendo um plasmídeo com o ponto de origem de replicação do fungo *Aspergillus nidulans*, junto ao promotor do gene da endopoligalacturonase, ligado ao gene da proteína verde fluorescente ('Green fluorescent protein'-GFP). Este gene da proteína verde fluorescente é uma versão modificada do gene originalmente isolado da medusa *Aequoria victoria* (Heim *et al.*, 1995), sendo um gene repórter. Assim, sua expressão pode ser monitorada em organismos vivos (*in situ*) quando utilizados detectores sensíveis à luz. A construção inserida também possui o gene de resistência à higromicina B. O gene da higromicina B codifica para higromicina B transferase, a qual atua na destoxificação, permitindo ao fungo transformado crescer em meio contendo esse antibiótico.

2.1.2 *Colletotrichum gossypii*

Colletotrichum gossypii South. é o agente causador da antracnose no algodoeiro (*Gossypium hisutum* L.). A antracnose, causada pelo fungo *C. gossypii*, é bastante problemática, já que este patógeno pode sobreviver saprofiticamente em restos de cultura, permanecendo viável por vários meses, ou associar-se a sementes, mantendo a viabilidade por três anos. Este patógeno sobrevive em solo contaminado e tem capacidade de se associar a diversas plantas do gênero *Gossypium* (Kimati, 1980).

Stakman e Harrar (1957) referem-se à longevidade do inóculo por meio de hifas e escleródios, informando que há hifas não que podem permanecer dentro de sementes por muito tempo, crescendo somente quando elas germinam. Estes autores citam entre, outros exemplos, que hifas não diferenciadas de *Glomerella gossypii* permaneceram em sementes de algodão por treze anos.

A reprodução sexual (fase meiospórica) é pouco conhecida em *C. gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides*. A forma sexual, *Glomerella gossypii* Edgerton, já foi descrita em isolados de algodoeiro (Edgerton, 1909).

No entanto, descrições genéticas posteriores não são encontradas na literatura, assim como poucos trabalhos envolvendo a fase assexuada (Silva-Mann *et al.*, 2002).

2.2 Fontes de variação genética

A origem de uma nova forma alélica é, basicamente, através de mutação. Novas combinações podem ser originadas da recombinação sexual. Esta é a forma comum de aumento da variabilidade genética. No entanto, em fungos filamentosos são conhecidas outras formas pelas quais podem ocorrer novas recombinações ou que podem aumentar a variabilidade genética. Algumas delas são: o ciclo parassexual e suas variações, o polimorfismo cromossômico, elementos citoplasmáticos e elementos transponíveis (Azevedo, 1987).

2.2.1 Reprodução sexual em *C. lindemuthianum*

A reprodução sexual no gênero *Glomerella* foi inicialmente estudada por Edgerton (1912, 1914), constituindo-se na primeira descrição da diferenciação sexual em ascomicetos (Wheeler, 1954). Mendes-Costa (1996) realizou estudos em *G. cingulata* f. sp. *phaseoli*, mostrando a natureza homotática deste fungo, contradizendo os resultados apresentados por Kimati e Galli (1970) e Bryson (1990), os quais descreveram comportamento heterotático para essa espécie.

De acordo com vários autores, *G. cingulata* f. sp. *phaseoli* produz peritécios mais ou menos arredondados de diâmetro variável (Kimati & Galli, 1970; Bryson, 1990). 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 e, à medida que o peritécio amadurece, tornam-se enegrecidos 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, mostram-se evanescentes. Os estudos descritivos realizados até agora nesta

espécie foram feitos com microscopia de luz (Kimati & Galli, 1970; Bryson, 1990, Mendes-Costa, 1996) ou eletrônica de transmissão (Roca *et al.*, 2000).

2.2.2 Polimorfismo cromossômico no gênero *Colletotrichum*

Por meio de eletroforese em campo pulsado foi observada em *C. gloeosporioides* isolado de *Stylosanthes*, na Austrália e em outros países, uma considerável variação em minicromossomos quanto ao número e tamanho (Masel *et al.*, 1990). Encontraram-se de 3 a 5 cromossomos de 2 a 6 Mb e entre 3 a 10 mini-cromossomos de 270 a 1.200 kb. Essa característica o que permitiu a divisão dos isolados em dois grupos, fundamentando-se no número de minicromossomos (Masel *et al.*, 1990). Em isolados de *Citrus* spp. o número de cromossomos variou entre 5 e 7 (Liyanage *et al.*, 1992).

Recentemente, O'Sullivan *et al.* (1998) fizeram um estudo com eletroforese em campo pulsado em vários isolados de *C. lindemuthianum*. Estes autores encontraram cromossomos maiores do que 10 Mb e também cromossomos com tamanho entre 0,5 e 2,0 Mb, corroborando com Roca (1997). Este último autor, utilizando microscopia de luz, mostra a existência de polimorfismo cromossômico numérico. Este polimorfismo encontrado parece ter-se originado de um processo de aneuploidização decorrente de uma reprodução parassexual e, provavelmente, de rearranjos cromossômicos de origem não definida (Roca, 1997).

Inúmeros fatores podem estar associados à origem do polimorfismo cromossômico em *C. lindemuthianum*. Alterações estruturais, por exemplo, são eventos que geram polimorfismo cromossômico e que ocorrem durante as divisões celulares (Mills & McCluskey, 1990; Kistler & Miao, 1992; Masel *et al.*, 1993a; b; He *et al.*, 1995). Por outro lado, Masel *et al.* (1996), em *C. gloeosporioides*, mostraram evidências moleculares de transferência horizontal de cromossomos entre isolados obtidos de *Stylosanthes*. Também foram

descritos retrotransposons em isolados de outras espécies dentro do gênero (He *et al.*, 1996; Zhu & Oudemans, 2000). Todos estes trabalhos mostram que mais de um mecanismo poderia estar envolvido no processo de ampliação da variabilidade genética.

2.2.3 Anastomoses entre conídios em *C. lindemuthianum*

Conexões entre células podem gerar heterocariose, como cita Griffiths (1995). Em eucariontes, vários tipos de conexões entre células também podem permitir a troca de material intracelular, tanto do núcleo inteiro como de cromossomos ou fragmentos de cromossomos (Takats, 1959). Conexões permitiriam também a troca de material genético extra-nuclear, como DNA mitocondrial ou plasmidial (Collins & Saville, 1990; Griffiths, 1995).

A heterocariose é conseguida em fungos filamentosos, por meio das anastomoses entre hifas que permitem a troca ou passagem do núcleo, bem como parte do citoplasma. Anastomoses entre hifas foram encontradas em *C. lindemuthianum*, porém, sem verificar a passagem de núcleo por Bos (1985) e Mendes-Costa, Davide e Roca (1998).

Outro tipo de modificação celular foi descrito com detalhes por Rodenhiser e Hurd-Karber (1947) em uredósporos de ferrugens de cereais e foi denominado *corpo de fusão*. Outros trabalhos foram publicados posteriormente (Manners & Bampton, 1957; Wilcoxson, Tuite & 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. Algumas observações já foram citadas em *C. gloeosporioides* (Uecker, 1994) e *C. lindemuthianum* (Mendes-Costa, 1996; Roca, 1997), mas descrições completas não foram encontradas.

Em isolados de *Verticillium albo-atrum*, o termo anastomose entre conídios já foi empregado (Schreiber & Green, 1966). Em *Ustilago maydis*

foram realizados alguns trabalhos de microscopia, mostrando núcleos nos *tubos de conjugação* (Snetselaar & Mims, 1992). Dados interessantes são descritos nesta espécie, em que uma definição de origem genética determina os encontros possíveis entre os esporos (Banuet & Herskowitz, 1994). No entanto, este fungo tem um ciclo de vida diferente do gênero *Colletotrichum*. Todos estes fungos, nos quais foram encontradas conexões entre conídios, parecem ser diferentes de *Colletotrichum* e há pouco em comum entre estes fitopatógenos.

Em *C. lindemuthianum*, o trabalho mais detalhado sobre anastomose entre conídios foi realizado por Roca (1997): *o núcleo pode encontrar-se perto da elongação, no meio desta ou evidenciando fusão*. Em alguns isolados, foram encontrados de um a três micronúcleos. Também foram encontradas anastomoses formadas por mais de dois conídios. Poucas quantificações foram realizadas neste trabalho. Uma delas mostrou que, de sessenta anastomoses entre dois conídios avaliados, 38,18% tinham um conídio binucleado; 5,46% tinham os dois conídios binucleados e 9,09% estavam com micronúcleos de formato alongado ou em forma de V nas anastomoses. Em outra quantificação, no mesmo trabalho, considerou-se uma única lâmina em que foi espalhado um acérvulo e com um mínimo de 10^4 conídios. Nesta lâmina obteve-se uma relação de uninucleados para binucleados de 3:1 sendo que, aproximadamente, a quantidade de binucleados foi de 3×10^5 . Foi considerado, neste trabalho, que 9,31% dos conídios observados estavam em anastomose e 22% destas anastomoses estavam com núcleo próximo ao início da anastomose e/ou com formato alongado, sugerindo migração.

Embora existam evidências citológicas (Roca, 1997) indicando eventos provavelmente envolvidos com a variabilidade da espécie, ainda não se sabe a dinâmica destes eventos, como ocorrem, quando ocorrem e se realmente geram algum tipo de variação.

2.2.4 Ciclo parassexual

As primeiras observações referentes ao ciclo parassexual em fungos filamentosos foram feitas no ano de 1952 por Pontecorvo e Roper. O ciclo parassexual leva à diploidização e à recombinação gênica, entretanto, na ausência de mecanismos sexuais. Diferentes etapas fazem parte desse processo: formação de um heterocário; fusão de dois núcleos haplóides diferentes; multiplicação do micélio diplóide heterozigoto resultante da fusão, podendo ocorrer a multiplicação do micélio com o núcleo haplóide; eventual estabelecimento do micélio diplóide que poderá ser isolado; permuta mitótica que poderá ocorrer durante a multiplicação do núcleo diplóide e haploidização vegetativa do núcleo diplóide (Pontecorvo, 1956).

A heterocariose é considerada o primeiro passo necessário para a confirmação do ciclo parassexual. Hastie (1981) cita dois 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*, em que há predominância de hifas com células uninucleadas, podendo 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 no heterocário. Fusões nucleares ocorrem ao acaso, porém, só fusões entre núcleos geneticamente diferentes são detectadas por meio de marcadores (Pontecorvo *et al.*, 1954). A frequência de conídios diplóides heterozigotos em *Aspergillus* é geralmente de 1 em 10^6 (Pontecorvo, 1953). Em *A. nidulans*, provas da diploidia podem ser obtidas com medidas de conídios, uma vez que conídios diplóides são maiores que os haplóides (Hastie, 1981). O

tamanho dos conídios pode ser influenciado por mutações, e no caso de diplóides instáveis, como os produzidos por *Verticillium albo-atrum*, que geram rapidamente segregantes haplóides, pode ser sugerida erroneamente a ausência de cariogamia, principalmente se são examinadas culturas velhas (Hastie, 1981).

A presença das colônias recombinantes segregantes, reconhecidas por meio de linhagens mutantes para a cor dos conídios e de mutantes deficientes nutricionais, é utilizada em *A. nidulans*, para o estudo genético do passo seguinte na parassexualidade. Aceita-se a hipótese de que este processo se dá por aneuplóides intermediários, isto é, ocorre uma série de aneuploidizações em que o diplóide heterozigoto vai perdendo cromossomos por meio de não-disjunções, presumivelmente ao acaso, até que o núcleo haplóide é formado (Azevedo, 1987; Kotlyarevskii & Levites, 1991; Bagagli, 1992).

Em *C. lindemuthianum*, o ciclo parassexual, como descrito por Pontecorvo (1956), 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. Por meio de fusão de protoplastos, também verificou microscopicamente a ocorrência de anastomoses. No seu trabalho, Bos (1985) encontrou prováveis diplóides, que reconheceu pela seleção com meio mínimo. O autor não encontrou conídios híbridos, nem recombinantes, portanto, não pode confirmar a cariogamia. Roca (1997) sugere que o ciclo parassexual poderia estar ocorrendo, supondo que o diplóide seria instável, utilizando como evidências citológicas as anastomoses entre conídios e as variações no número de cromossomos.

Dutta e Garber (1960), pela indução com luz ultravioleta, encontraram isolados mutantes deficientes em nutrição e cor, em duas 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.

A transmissão e modificação de marcadores de transformação durante o ciclo parassexual induzido em *Penicillium roqueforti* foram investigadas por Durand *et al.* (1992). Protoplastos de duas linhagens selvagens de *P. roqueforti* foram transformados para resistência à higromicina B e fleomicina, utilizando genes de resistência. Foi realizada fusão de protoplastos das linhagens transformadas, tendo como finalidade a obtenção de híbridos diplóides. Após haploidização, segregantes caracterizados por um rearranjo dos marcadores parentais foram isolados, indicando a ocorrência de recombinação durante o ciclo parassexual.

2.2.5 Variações do ciclo parassexual

2.2.5.1 Parameiose

Após a formação de heterocários rapidamente podem ocorrer recombinantes, indicando a formação instável do diplóide. Isto seria uma variação do ciclo parassexual. O diplóide e os recombinantes em *Acremonium chrysogenum* foram difíceis de isolar e os possíveis aneuplóides foram isolados diretamente de um estágio heterocariótico (Ball & Hamlyn, 1978). Eventos parecidos foram também descritos em *Cephalosporium acremonium* (Ball & Hamlyn, 1982) e *Aspergillus niger* (Bonatelli *et al.*, 1983). Em *A. niger*, em que diplóides e haplóides recombinantes foram encontrados, sugeriu-se que os núcleos diplóides passaram por um processo semelhante à meiose, mas não foi acompanhado pelo processo de diferenciação das estruturas sexuais. Este processo foi chamado de parameiose para caracterizar uma meiose primitiva (Bonatelli *et al.*, 1983; Bagagli *et al.*, 1991). A diferença básica entre a meiose e a parameiose seria que a primeira forma um diplóide e tem uma divisão reducional característica. A diferença entre a parassexualidade e a parameiose seria, basicamente, que, no último caso, o diplóide se mantém instável, sendo difícil o seu isolamento.

Em várias espécies de fungos, diplóides não têm sido isolados ou se mostram muito instáveis, mas os recombinantes foram isolados. Tais exemplos existem em *A. niger* (Bonatelli *et al.*, 1983), *Beauveria bassiana* (Paccola-Meirelles & Azevedo, 1991), *Cephalosporium acremonium* (Hamlyn *et al.*, 1985), *Metarhizium anisopliae* (Bagagli *et al.*, 1991), *Verticillium* (Hastie & Heale, 1984) e *Trichoderma pseudokoningii* (Bagagli *et al.*, 1995).

2.2.5.2 Outras variações

No gênero *Trichoderma* foram promovidas fusões de protoplastos intra e interlinhagens (Stasz & Harman, 1990) e avaliadas as culturas utilizando diferentes marcas auxotróficas e padrões isoenzimáticos. Foi verificada a ocorrência de complementação nos cruzamentos intralinhagens e possíveis heterocários balanceados, porém, não houve a evidência de diplóides e/ou recombinantes. No caso dos cruzamentos interlinhagens, em que foi baixa a complementação, houve formação de prototróficos, porém, não foram encontradas evidências de formação de diplóides, haplóides e/ou aneuplóides. Os autores concluíram que a parassexualidade devia ocorrer muito rapidamente, raramente e/ou nunca e, também, que outros mecanismos deviam estar envolvidos para o surgimento de tipos não parentais. Estes autores sugeriram a explicação de que um dos núcleos do heterocário podia ser degradado e seu material genético ser incorporado ao núcleo remanescente.

Em heterocários de *Trichoderma*, obtidos pela transferência de núcleos de protoplastos, foi observado que só um dos núcleos se expressa e, com o tempo, pode mudar a sua expressão (Sivan *et al.*, 1990). Por outro lado, Caten (1981) verificou que em *Humicola* sp. foram formados diplóides diretamente da mistura de mutantes auxotróficos em meio mínimo, sem a formação do heterocário. Encontramos alguns termos na literatura, além de parameiosc, como, por exemplo, um mecanismo de intertransformação natural, como

sugerido para *Trichoderma* (Stasz & Harman, 1990); um sistema de transferência de cromossomos sem a formação do diplóide ou uma meiose muito rápida em *Ustilago violacea* (Day, 1978).

2.3 Técnicas utilizadas para estudo da variabilidade genética

2.3.1 Protoplastos

Os protoplastos são células desprovidas de parede celular ou com parede muito fina. São chamadas também esferoplastos porque as células apresentam um formato arredondado (Pizzirani-Kleiner *et al.*, 1998). O isolamento de protoplastos de fungos pode ter várias utilidades para estudos genéticos, como induzir a fusão entre protoplastos originados de espécies incompatíveis, fazer transformação genética e realizar extração de DNA *in situ* (Bos, 1985; Ogawa *et al.*, 1987; Rodriguez & Redman, 1992).

Os protoplastos são obtidos, principalmente, por meio do emprego de enzimas que digerem a parede celular. A utilização de diferentes coquetéis enzimáticos em fungos filamentosos é necessária, em função da composição da parede celular de cada espécie. *C. lindemuthianum* tem diferentes componentes na parede celular, que podem variar dependendo da estrutura e do estado fisiológico em que se encontram as células (Pain *et al.*, 1996; Roca *et al.*, 2000). Entre estes componentes encontram-se: β 1-3 e β 1-4 glucanos, manose, galactose, arabinose, ramnose, N-acetil glucosamina, quitina e ribose (Pain *et al.*, 1994; 1996). Os componentes da parede celular mais estudados e conhecidos em termos fitopatológicos são as β 1-3 glucanases e quitinases (Sengbusch *et al.*, 1983; O'Connell *et al.*, 1992).

Embora algumas diferenças possam existir na composição da parede celular entre espécies de fungos, existe um grupo de enzimas comerciais que são utilizadas com frequência em diversos trabalhos. As mais encontradas são:

i) Novozym™234 (Interspex): α , 1-3 e α , 1-4 glucanase, lâminarinase, xilanase, quitinase, protease.

ii) Glucanex™ (Novo Nordisk): β glucosidase e traços de outras enzimas.

iii) Driselase e β -D glucanase (Interspex): exo e endo (1-3) β -D glucanase, (1-6) β -D glucanase, β -D glucosidase, α -amilase, D-galacturonase, (1-3) β -D glucanase.

Diversos estudos já foram realizados com este grupo de enzimas em diversos fungos. Entre estes, há alguns relacionados a diferentes técnicas, tais como extração de DNA *in situ* para separação de moléculas inteiras de DNA (Orbach *et al.*, 1988; O'Sullivan *et al.*, 1998), PCR direto em protoplastos (Zcijl *et al.*, 1998), produção e regeneração de protoplastos (Cheng & Bélanger, 2000).

2.3.2 PCR (*Polymerase chain reaction*)

Identificar isolados diferentes, de uma forma confiável, é essencial em estudos genéticos. Análises genéticas têm sido feitas com diversos tipos de marcas morfológicas, químicas, etc. Atualmente, marcadores moleculares são utilizados para fazer estudos genéticos em fungos filamentosos. Marcas simples, com bastante repetibilidade, são obtidas quando se utiliza o reconhecimento de seqüências de DNA. Regiões homólogas são reconhecidas por iniciadores de DNA (primers). Com o uso de condições de reações específicas para a duplicação do DNA, podem ser realizadas ampliações e o produto pode ser observado posteriormente. Estas ampliações ocorrem em condições de aumento e redução de temperaturas em que uma DNA polimerase atua. Na reação ocorre então desnaturação, anelamento e extensão do DNA (McPherson & Moler, 2000).

Para desenhar os iniciadores de DNA, seqüências devem ser conhecidas previamente. Quando não se está realizando seqüenciamento do DNA, uma das formas seria utilizar seqüências previamente publicadas (McPherson & Moler,

2000). No endereço eletrônico do GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, estão depositados dados atualizados sobre seqüências de nucleotídeos e aminoácidos. Estes dados estão disponíveis de forma rápida e gratuita. Informações deste tipo permitem fazer comparações entre diversas seqüências para ver o grau de homologia entre fragmentos de DNA e proteínas.

Com dados publicados podem ser feitas comparações de alguns fragmentos de DNA em diferentes organismos, uma vez que existem algumas seqüências que são conservadas e, utilizando-se programas que alinham estes fragmentos, são conseguidos dados estatísticos sobre o grau de pareamento ou similaridade. A partir de essas seqüências, podem ser desenhados iniciadores de DNA ou primers, considerando-se algumas características como: quantidade de guanina (G) e citosina (C), comprimento dos iniciadores, pontas com C e G e não complementares e temperaturas de anelamento acima de 55°C, entre outras. Existem programas que fazem isto ou podem ser utilizadas fórmulas para auxiliar a calcular a temperatura de anelamento (McPherson & Møler, 2000).

2.3.3 Microscopia eletrônica

A microscopia eletrônica permite o estudo de características anatômicas e estruturais que a microscopia de luz não consegue. Isto se deve principalmente ao fato do microscópio eletrônico utilizar feixe de elétrons no lugar da luz branca, ultravioleta ou laser, o que permite maior resolução da imagem quando utilizam-se grandes aumentos. Além disso, as condições nas quais são apresentadas as imagens também contribuem. Isto está diretamente relacionado ao tratamento da amostra. Na microscopia eletrônica de varredura (MEV) podem ser feitas amostragens da estrutura externa, sendo que artefatos são mais difíceis de ocorrer (Walsh, 1998). No microscópio eletrônico de transmissão (MET) são feitos cortes ultrafinos que permitem visualizar estruturas internas com detalhes, tais como poros da carioteca (Heath & Heath, 1976), detalhes no formato da

mitocôndria e diversos microcorpos no citoplasma (Zickler & Olson, 1975; Vannini & Mares, 1975; Snetselaar & Mims, 1992).

Alguns trabalhos sobre a ultra-estrutura de *Colletotrichum* tem sido realizados (VanDyke & Mims, 1991; Roca *et al.*, 2000), sendo a maioria relacionada à penetração do fungo no hospedeiro (Rawlinson *et al.*, 1975; Mercer *et al.*, 1975). Também são encontrados alguns trabalhos em microscopia eletrônica de varredura (Roberts & Snow, 1984; Ogle, Gowanlock & Irwin, 1990; Stein *et al.*, 1993). É interessante salientar que estes trabalhos utilizaram metodologias ou amostragens diferentes, o que dificulta a realização de estudos comparativos e discussões.

2.3.4 Microscopia de fluorescência e laser

A microscopia de fluorescência e o uso de fluorocromos têm vantagens sobre o microscópio de luz branca porque o uso de diferentes cores sobre um fundo preto permite uma melhor definição de algumas estruturas. Estudos genéticos podem ser facilitados enormemente com o uso de fluorocromos vitais, que permitem a análise 'in vivo' dos fenômenos celulares (Gilroy, 1997), além de oferecer outras vantagens, como economia de tempo, dispensando-se fixações e pré-tratamentos. Os fluorocromos vitais também permitem ver o movimento de organelas e migrações que ocorrem entre compartimentos celulares (Haugland, 1996). Normalmente, apresentam também excelente contraste para a visualização das estruturas a serem coradas. Este tipo de estudo já foi realizado com sucesso em outros fungos (Galbraith, 1984; Nelson, 1994).

Com o microscópio confocal, que utiliza o raio laser é possível fazer cortes óticos, a partir de três ângulos diferentes. Essa característica permite, por meio de manipulação das imagens, obter estruturas tridimensionais ou reconstruções que contornam o problema de profundidade de campo, que

ocorrem com freqüência num microscópio de luz convencional (Hochstrasser & Sedat, 1987; White *et al.*, 1987; Czymbek *et al.*, 1994).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. *Introductory mycology*. 4.ed. New York: J. Wiley and Sons. USA, 1996. 866p.

ARX, A.V. Die Arten der Gattung *Colletotrichum* Cda. *Phytopath. Z.* v. 29, p.413-468, 1957.

AZEVEDO, J. L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S. O. P. (Ed.). *Genética molecular e de microrganismos*. São Paulo: Manole, 1987. p. 393-407.

BAGAGLI, E. Parassexualidade e preservação de *Metharhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin e *Trichoderma pseudokoningii* (Rifai). 1992. 142p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.

BAGAGLI, E. *et al.* Genetic recombinants in *Trichoderma pseudokoningii* (Rifai) without typical parasexuality. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1132-1134, 1995.

BAGAGLI, E. ; VALADARES, M. C. C.; AZEVEDO, J. L. Parameiosis in the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorokin. *Revista Brasileira de Genética*. São Carlos, v. 14, n. 2, p. 261-272, 1991.

BALL, C.; HAMLYN, P. F. The genetics of *Acremonium chrysogenum*. *Revista Brasileira de Genética*. São Carlos, v.1, p. 83-96, 1978.

BALL, C.; HAMLYN, P.F. Genetic recombination studies with *Cephalosporium acremonium* related to the production of the industrially important antibiotic Cephalosporin. *Revista Brasileira de Genética*, São Carlos, v. 5, p. 1-13, 1982.

BATISTA, U.G.; CHAVES, G.M. Patogenicidade de culturas monoasospóricas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. *Fitopatologia Brasileira*, Brasília, v.7, n.2, p.285-293, jun. 1982.

BONATELLI JR., R.; AZEVEDO, J. L.; VALENT, G. V. Parasexuality in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Revista Brasileira de Genética*, v. 6, p. 399-405, 1983.

BANUET, F.; HERSKOWITZ, I. Morphological transitions in the life cycle of *Ustilago maydis* and their genetic control by the a and b loci. *Experimental Mycology*, v.18, n.4, p.246-267, Dec. 1994.

BOS, C. J Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi, 1985. 156p. Teses (Ph.D)-Wageningen Agricultural University, Wageningen.

BRYGOO, Y. *et al.* Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Ed.). *Molecular variability of fungal pathogens*. Wallingford: CAB International. 1998. p. 133-148.

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.672-677, June 1991.

BRYSON, R. J. Sexual hybridisation and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*. 1990. 285p. Teses. (Ph.D.)-University of Birmingham. Birmingham.

CATEN, C.E. Parasexual process in fungi. In: GULL, K.; OLIVER, S.G.; *The fungal nucleus*. Cambridge: Cambridge University, 1981. p. 191-214.

CISAR, C.; TEBEEST, D. Mating system of the filamentous ascomycete, *Glomerella cingulata* *Current Genetics*, v.35, p.127-133. 1999.

CHENG, Y. BÉLANGER, R.R. Protoplast preparation and regeneration from spores of the biocontrol fungus *Pseudozyma flocculosa*. *FEMS Microbiology Letters*, v.190, p.287-291. 2000.

COLLINS, R.A.; SAVILLE, B.J. Independent transfer of mitochondrial chromosomes and plasmids during unstable vegetative fusion in *Neurospora*. *Nature*, London, v. 345, n. 6270, May 1990.

CZYMMEK, K.J.; WHALLON, J. H.; KLOMPARENS, K.L. Confocal microscopy in mycological research. *Experimental Mycology*, v.18, p.275-293, 1994.

DAY, A.W. Chromosome transfer in dykaryons of a smut fungus. *Nature*, Londres, v. 273, p.753-755, 1978.

DUMAS, B. et al. Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v.65, n.4, p. 1769-1771, 1999.

DURAND, N.; REYMOND, P.; FÈVRE, M. Transmission and modification of transformation markers during an induced parasexual cycle in *Penicillium roqueforti*. *Current Genetics*, v. 21, p. 377-383, 1992.

DUTTA, S.K.; GARBER, E.D. Genetics of phytopathogenic fungi III. An attempt to demonstrate the parasexual cycle in *Colletotrichum lagenarium*. *Botanical Gazette*, Chicago, v.122, p.118-121, 1960.

EDGERTON, C. W. The perfect stage of the cotton anthracnose. *Mycologia*, v.1, n.1, p.115-120, 1909.

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.

GALBRAITH, D.W. Selection of somatic hybrid cells by fluorescence-activated cell sorting. In: VASIL, I. (Ed.). *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Orlando: Academic, 1984. v.1, p.433-447.

GILROY, S. Fluorescence microscopy of living cells. *Annual Review of Plant Physiological and Plant Molecular Biology*, v.48, p.165-190, 1997.

GRIFFITHS, A.J.F. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews*, Washington, v.59, n.4, p.673-685, 1995.

HAMLIN, P. F. *et al.* Protoplast fusion as a tool for genetic analysis in *Cephalosporium acremonium*. *Journal of General Microbiology*, v. 131, p. 2813-2823, 1985.

HASTIE, A. C.; HEALE, J. B. Genetics of *Verticillium*. *Phytopathology Mediterranea*, Bologna, v. 22, p. 130-162, 1984.

HASTIE, A.C. The genetics of conidial fungi . In: COLE, G.T.; KENDRICK, B. (Ed.). *Biology of conidial fungi*. New York: Academic, 1981. v.2, p.511-547.

HAUGLAND, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6.ed.edn.. Eugene-OR, USA. Molecular Probes, 1996. 200p.

HE, C. *et al.* 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.

HE, C. *et al.* Cg T1: a non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular General Genetics*, v.252, p.320-331. 1996.

HE, C. *et al.* Transfer of a supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Genetics*, v.150, p. 459-466. 1998.

HEATH B.; HEATH, C. Ultrastructure of mitosis in the cowpea rust fungus *Uromyces phaseoli* var. *vignae*. *The Journal of Cell Biology*, v.70, p.592-607, 1976.

HEIM, R.; CUBITT, A.B.; TSLEN, R.Y. Improved green fluorescence. *Nature*, Londres, v.373, n. 6516, p.663-664, Feb. 1995.

HOCHSTRASSER, M.; SEDAT, J.W. Three-Dimensional Organization of *Drosophila melanogaster* Interphase Nuclei. II. Chromosome Spatial Organization and Gene Regulation. *The Journal of Cell Biology*. v.104, p. 1471-1483. June 1987.

KIMATI, H. Doenças do algodoeiro *Gossypium* spp. In: GALLI, F. (Ed.). *Manual de fitopatologia*. São Paulo: Ceres, 1980. v.2.

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.
- 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.
- LATUNDE-DADA, A. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, v. 2, n. 4, p. 187-198, July 2001.
- 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.
- 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.
- 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 *et al.* Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Flavour and Fragrance Journal*. Chinchester, v.18, p.81-86, 1990.

MASEL, A.M *et al.* Molecular evidence for chromosome transfer between biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides*. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, St. Paul, v.95, n.5, p.339-348, 1996.

MC PHERSON, M.J.; MØLLER, S.G. PCR. Oxford: BIOS. 2000. 276p.

MEDEIROS, J. Aspectos da biologia de *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenk (Forma anamórfica *Colletotrichum gloeosporioides* Penz). 1988. 80p. Dissertação (Mestrado em Botânica)-Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

MENDES-COSTA, M. C.. Genetics of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* l. Sexual compatibility. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, p.350, 1996.

MENDES-COSTA, M.C.; DAVIDE, L.C. ROCA M., M.G. Cytology of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner 'in vitro'. **Ciência e Agrotecnologia**. Lavras, v.22, n.2, 250-253, 1998.

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.

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.

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.

NELSON, B.D. Vital staining of fungal nuclei with the bis-benzimidazole fluorochrome Hoescht 33342. **Phytopathology**, v.84, p.1125, 1994.

O'CONNELL, R.J.; NASH, C.; BAILEY, J.A. Lectin cytochemistry: a new approach to understanding cell differentiation, pathogenesis and taxonomy in *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C.A.B. International. 1992. p. 67-87.

- OGAWA, K.; BROWN, J. A.; WOOD, T. M. Intraspecific hybridization of *Trichoderma reesei* QM 9414 by protoplast fusion using colour mutants. **Enzyme Microbiology and Technology**, v.9, p. 229-232, 1987.
- OGLE, H.J.; GOWANLOCK, D.H.; IRWIN, J.A.G. Infection of *Stylosanthes guianensis* and *S. scabra* by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Phytopathology**, v. 80, n.9, p. 837-842, 1990.
- ORBACH, M. J.; VOLLRATH, D.; DAVIS, R. W.; YANOFSKY, C. An electrophoretic karyotype of *Neurospora crassa*. **Molecular and Cell Biology**, v.8, n. 4, p.1469-1473, 1988.
- OSHEROV, N.; MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. **FEMS Microbiology Letters**. v. 199, p.153-160, 2001.
- O'SULLIVAN, D. *et al.* T. Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. **Current Genetics**, v.33, p.291-298, 1998.
- PACCOLLA – MAIRELLES, L.; AZEVEDO, J. L. Parasexuality in *Beauveria bassiana*. **Journal of Invertebrate Pathology**, San Diego, v. 57, p.172– 176, 1991.
- PAIN, N.A. *et al.* Composition and organization of extracellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Protoplasma**, v.190, p. 119-130, 1996.
- PAIN, N.A. *et al.* Immunomagnetic isolation of viable intracellular hyphae of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Briosi & Cav. From infected bean leaves using a monoclonal antibody. **New Phytologist**, Cambridge, v.127, n. 1, p. 223-232, May 1994.
- PERFECT, S.E.; HUGHES, H.B.; O'CONNELL, R.J. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, v.27, p.186-198, 1999.
- PIZZIRANI-KLEINER, A.A.; PEREIRA, J.O; AZEVEDO, J.L. **Genética de fungos no laboratório**. Manaus: Universidade do Amazonas. 1998. 138p.

PONTECORVO, G. Genetic analysis without sexual reproduction by means of polyploidy in *Aspergillus nidulans*. *Journal General Microbiology*, SpencersWood, v.10, p.7-8, 1952.

PONTECORVO, G. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in Genetics*, New York, v.5, p.141-238, 1953.

PONTECORVO, G. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics*, Bangalore, v.52, p. 226- 237, 1954.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.10, p.393-400, 1956.

RAVA, C.A.; MOLINA, J.; KAUFFMANN, M.; BRIONES, I. Determinación de razas fisiológicas de *Colletotrichum lindemuthianum* en Nicaragua. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, v.18, n.3, p.388-391, set. 1993.

RAVA, A.C.; SARTORATO, A. Antracnose. In: RAVA, A.C.; SARTORATO, A.. (Ed.). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasilia: EMBRAPA, 1994. p.17-40.

RAVA, A.C.; PURCHIO, A.F.; SARTORATO, A. Caracterizacao de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, v.19, n.2, p.167-172, jun. 1994.

RAWLINSON, C.J.; CARPENTER, J.M.; MUTHYALU, G. Double-stranded RNA virus in *Colletotrichum lindemuthianum*. *Transactions British Mycological Society*, v.65, n.2, p.305-341, 1975.

RIKKERINK, H.; SOLON, S.L.; CROWHURST, R.N.; TEMPLETON, M. D. Integration of vectors by homologous recombination in the plant pathogen *Glomerella cingulata*. *Currente Genetics*, v.25, n.3, p.202-208, 1994.

ROBERTS, R.; SNOW, J.P. Histopathology of cotton Boll Rot caused by *Colletotrichum capsici*. *Phytopathology*, v.78, p.390-397, 1984.

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

- ROCA M. M.G. *et al.* Ultrastructural aspects in perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.223-225, 2000.
- RODENHIESER, H.A. HURD-KARBER, A. Evidence of fusion bodies from urediospore germ tubes of cereal rusts on nutrient-solution agar. *Phytopathology*, v.47, p.744-756, 1947.
- RODRIGUES, E.C. Caracterização citogenética e bioquímica do fungo celulolítico *Humicola* sp. 1987. 152 p. Dissertação (Mestrado Microbiologia Agrícola)-Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba.
- RODRIGUEZ, R.J.; REDMAN, R.S. Molecular transformation and genome analysis of *Colletotrichum*. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C.A.B. International. 1992. p. 47-66.
- RODRIGUEZ, R.J.; YODER, O.C. A family of conserved repetitive DNA elements from the fungal plant pathogen *Glomerella cingulata* (*Colletotrichum lindemuthianum*). *Experimental Mycology*, v.15, p. 232-242, 1991.
- SACCARDO, P.A. *Sylloge fungorum: omnium huius que cognitorum*. Abellini: Typis Pergola, 1944. v.22, p.77.
- 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.
- SENGBUSCH, P.V.; HECHLER, J.; MÜLLER, U. Molecular architecture of fungal cell wall. An approach by use of fluorescent markers. *European Journal of Cell Biology*, v.30, p.305-312, 1983.
- SICARD, D., MICHALAKIS, Y., DRON, M.; NEEMA, C. Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centres of origin of its wild host *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, v.87, p.807-813. 1997.

SIVAN, A.; HARMAN, G. E.; STASZ, T. E. Transfer of isolated nuclei into protoplasts of *Trichoderma harzianum*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 2404-2409, 1990.

SILVA-MANN, R.; SALGADO, K.; VIEIRA, M. MACHADO, J.C. Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados a sementes de algodoeiro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. **Fitopatologia Brasileira**. 2002 (no prelo).

SNETSELAAR, K.M.; MIMS, C.W. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. **Mycologia**, v.84, n.2, p.193-203 Mar./Apr. 1992.

STAKMAN, E.C.; HARRAR, J.G. **Principles of plant pathology**. New York: The Ronald, 1957. 581p

STASZ, T. E.; HARMAN, G. E. Nonparental progeny resulting from protoplast fusion in *Trichoderma* in the absence of parasexuality. **Experimental Mycology**, v. 14, p. 145-159, 1990.

STEIN, B.D.; KLOMPARENS, K.L.; HAMMERSCHMIDT, R. Histochemistry and ultrastructures of the induced resistance response of Cucumber Plants to *Colletotrichum lagenarium*. **Journal of Phytopathology**, v.137, p.177-178, 1993.

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. (Ed.). **Handbook of microbiology**. Cleveland: CRC, 1974. 328p.

TAKATS, S. Chromatin extrusion and DNA transfer during microsporogenesis. **Chromosoma**, Berlin. v. 10, p. 430-453, 1959.

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. Ultrastructure 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.
- VANNINI, G.L.; MARES, D. Fine structural characterization of microbodies and woronin bodies in *Trichophyton mentagrophytes*. *Experientia*, v. 31, n.8. p 949-951, 1975.
- WALSH, R. SEM preparation of fungi grown on agar. *Microscopy Today*, p.21, May 1998.
- WHEELER, H.E. Genetics and evolution of heterotalismo in *Glomerella*. *Phytopathology*, St. Paul, v.44, n.7, p.342-345, July 1954.
- WHITE, J.G.; AMOS, W.B.; FORDHAM, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *The Journal of Cell Biology*, v.105, p. 41-48, July 1987.
- WILCOXSON, R.D.; TUIITE, J.F.; TUCKER, S. Urediospore germ tube fusions in *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, St. Paul, v.48, p.358-361, 1958.
- ZEIJL VAN, C. M. J.*et al.* An improved colony-PCR method for filamentous fungi for amplification of PCR-fragments of several kilobases. *Journal of Biotechnology*, v.59, p.221-224, 1998.
- ZHU, P.; OUDEMANS, P.V. A long terminal repeat retrotransposon Cgret from the phytopathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* on cranberry. *Current Genetics*, v.38, 241-247, 2000.
- ZYCKLER, L.; OLSON, D. The synaptonemal complex and the spindle plaque during meiosis in yeast. *Chromosoma*, Berlin . v.50, p.1-23, 1975.

**ASPECTOS ESTRUTURAIS DA ESPORULAÇÃO DO
AGENTE CAUSAL DA ANTRACNOSE NO FEIJOEIRO**

CAPÍTULO I

RESUMO

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Aspectos estruturais da esporulação do agente causal da antracnose no feijoeiro. In: _____. **Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios**. 2002. Cap. 1, p. 29-48. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*

Em fungos filamentosos, o processo de esporulação é muito importante para a sobrevivência e para a dispersão da espécie. Neste estudo, utilizou-se o fungo causador da antracnose no feijoeiro, *Colletotrichum lindemuthianum*, que normalmente apresenta reprodução assexual. Foi utilizada microscopia eletrônica de varredura para comparar a esporulação de isolados e em vagens com lesões de antracnose na planta. Foram avaliados a produção de conídios em acérvulos, a produção de ascósporos em peritécios e o microciclo de esporulação. *C. lindemuthianum* comportou-se de forma dimórfica em um único isolado e somente em condições de laboratório.

* Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Professora orientadora). Alan E. Wheals - University of Bath-UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

ABSTRACT

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Structural aspects of sporulation of the causal anthracnose agent on the common bean In: _____. *Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios*. 2002. Cap. 1, p. 29-48. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

In filamentous fungi sporulation is very important for survival and to spread the specie. In this study the fungus that causes anthracnose on the common bean, *Colletotrichum lindemuthianum* was used. It is usually found with asexual reproduction. It was used scanning electron microscopy to compare the sporulation of this fungus in isolated strains and in disease lesions of the plant. This study evaluated the conidia production in acervulus, ascospores production in perithecium and microcycle sporulation. Only one isolate of *C. lindemuthianum* has shown dimorphic behavior in laboratory conditions.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Alan E. Wheals - University of Bath-UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

1.1 INTRODUÇÃO

O agente causal da antracnose no feijoeiro, *Colletotrichum lindemuthianum*, produz conídios para a disseminação da espécie. No caso de muitos fungos, a disseminação em estado de dormência garante a propagação da espécie e é seguida pelo processo de germinação, o qual restaura a atividade metabólica e o desenvolvimento vegetativo do fungo (Osherov & May, 2001). No entanto, em condições de laboratório, foi observada a produção de ascósporos, provenientes de reprodução sexual (forma meiospórica ou teleomórfica = *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*) (Kimati & Galli, 1970; Bryson, 1990; Roca *et al.*, 2000).

Em certas condições, os fungos filamentosos podem produzir esporos originados de outro esporo. Este tipo de reprodução é conhecida como microciclo de esporulação e pode ocorrer devido a fatores ambientais (nutrientes e pH, por exemplo) ou mutações (Deacon, 1997). O microciclo de esporulação foi registrado com maior frequência em função de efeito ambiental (Deacon, 1997) do que por mutações (Nordbring-Hertz *et al.*, 1995; Bailey & Ebbole, 1998). Em *Colletotrichum*, uma única publicação disponível foi encontrada com uma curta descrição (Atkinson, 1891). Quando o microciclo de esporulação ou a produção de microconídios é constante em algum isolado, além de útil como marcador morfológico para a condução de trabalhos de genética, permite conduzir com maior facilidade estudos sobre o ciclo celular (Wheeler & Driver, 1953)

O objetivo deste trabalho foi comparar as características morfológicas dos diferentes tipos de esporulação encontrados em isolados de *C. lindemuthianum*, provenientes de meios de cultura e do substrato natural. Para isso, utilizou-se microscopia eletrônica de varredura.



1.2 MATERIAL E MÉTODOS

1.2.1 Amostragem

Foram utilizados dois tipos de amostras: três isolados e vagens de feijoeiro com lesões de antracnose coletadas no campo (substrato natural).

1.2.1.1 Amostras do substrato natural

O primeiro grupo de amostras (nº 1, 2 e 3) compôs-se de várias vagens de três cultivares diferentes, obtidas diretamente de plantas infectadas em lavouras de feijoeiro (Tabela 1). As vagens com sintomas de antracnose, provenientes do campo, foram mantidas por três dias em câmara úmida, à temperatura e luz ambiente, para intensificar a esporulação. Algumas lesões foram transferidas para batata-destrose-ágar (BDA) para obter e manter os isolados em M₃ (Junqueira *et al.*, 1984) e, posteriormente, identificar as raças fisiológicas. Pelo menos duas vagens com lesões foram fixadas posteriormente.

1.2.1.2 Isolados

Os isolados estavam disponíveis na micoteca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (Tabela 1). Destes isolados, foram obtidas culturas monospóricas de suspensões de conídios, que foram diluídas e inoculadas em placas de petri com meio de cultura. Os conídios germinados foram, a seguir, micromanipulados com uma agulha.

As culturas monospóricas foram mantidas em meio ágar aveia (MA), BDA e/ou M₃ (Junqueira *et al.*, 1984), sob condições de temperatura e luz controladas (Tabela 1). Os isolados utilizados possuíam diferentes características como microciclo de esporulação (ms) e reprodução sexual (rx).

TABELA 1 Isolados utilizados e principais características das amostras oriundas da natureza e do laboratório.

N.º	Isolado	Raça	Origem	Cultivar	Amostra
01	campo	-	Bom Sucesso/MG	desconhecida	lesões de vagens
02	campo	-	Lambari/MG	Ouro	lesões de vagens
03	campo	-	Lambari/MG	CariocaMG	lesões de vagens
04	1027f	2047	América Central	-	vagem em MA
05	1002m	81	Lavras/MG	-	vagem em M ₃
06	531 m	0	Lavras/MG	-	folha em M ₃ (rx)
07	531-5	0	Lavras/MG	-	vagem em MA (ms)
08	531-5	0	Lavras/MG	-	vagem em M ₃ (ms)
09	531-5	0	Lavras/MG	-	membrana de nylon (ms)

rx= reprodução sexual; ms= microciclo de esporulação.

Para estimular a esporulação, os isolados foram transferidos sobre vagens ou folhas previamente autoclavadas (três vezes), em tubos de ensaio com meio de cultura.

1.2.2 Definição das raças fisiológicas

Para confirmar a identidade das raças de *C. lindemuthianum* utilizadas, os isolados foram inoculados em cultivares diferenciadoras de feijoeiro (Rava *et al.*, 1993). Para cada isolado, dez sementes de cada cultivar diferenciadora foram semeadas em bandejas plásticas contendo solo da mesma procedência. Uma semana após a semeadura, uma suspensão contendo $1,2 \times 10^6$ de esporos/ml foi aplicada sobre as plântulas, com auxílio de um pincel, em ambas as faces das folhas. Em seguida, as plântulas foram incubadas em câmara a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar acima de 95% e fotoperíodo de 12 horas, durante três dias. Transcorridos estes dias, as bandejas foram colocadas em casa de vegetação. Após sete dias, foram avaliados os sintomas de acordo com a escala apresentada por Rava *et al.* (1993).

1.2.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram compostas da própria folha ou vagem inoculadas com os isolados ou com lesões (substrato natural). Apenas uma amostra foi retirada da membrana de nylon, passando-a sobre a colônia do fungo em esporulação com M_3 (Tabela 1). Todo o material foi monitorado previamente com microscopia de luz.

As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato 0,05 M; pH 7 por uma semana a 4°C. Posteriormente foram lavadas três vezes no tampão. As amostras foram embebidas por uma hora em tetraóxido de ósmio 2% (tampão cacodilato 0,1M; pH 7,2) e desidratadas inicialmente em uma série de acetona (30% a 100%). As amostras para o MEV foram desidratadas finalmente até o ponto crítico, utilizando CO_2 líquido, montadas em cima de suportes próprios do MEV e cobertos com ouro/paládio. Foi observado todo o pedaço de vagem que estava fixado no suporte com um microscópio eletrônico de varredura Zeiss, DSM 940, pertencente ao (NAP/MEPA) da ESALQ-USP, Piracicaba, SP. Para algumas amostras foram realizadas medições (dez repetições) diretamente das células, com recursos próprios do microscópio.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Amostras do substrato natural

Nas amostras nº 1, 2 e 3, duas regiões da vagem foram encontradas e analisadas: a região da vagem lesionada pelo patógeno (Figura 1) e a região adjacente às lesões (Figura 2).

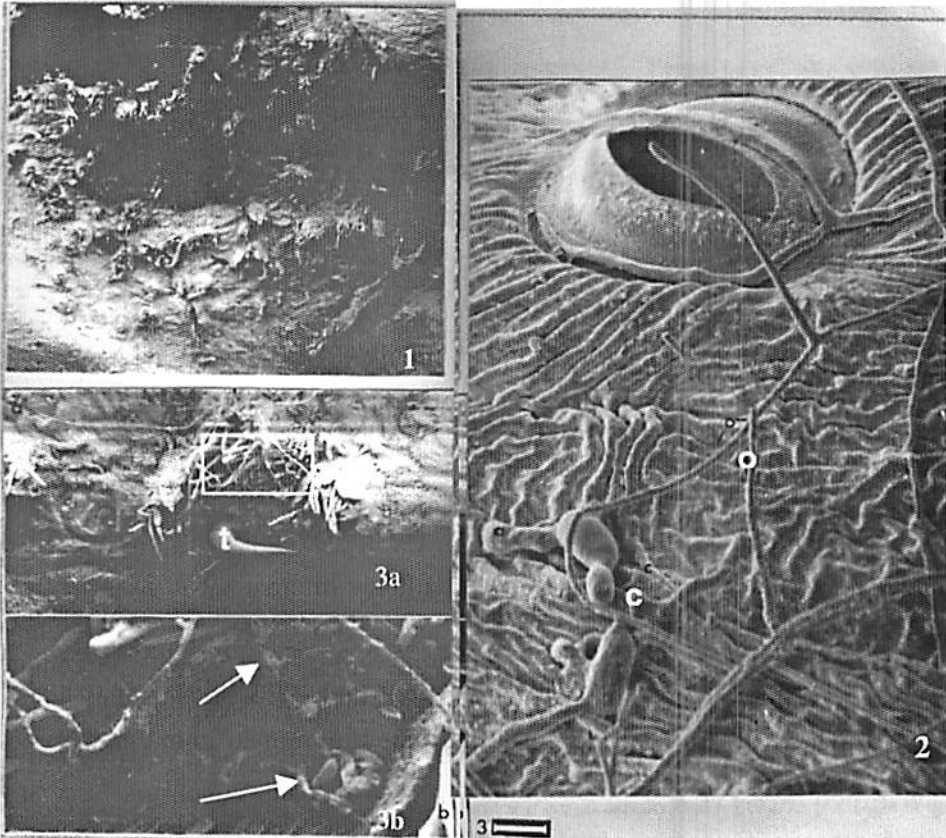
A região lesionada pelo patógeno apresentou células mortas (Figura 1), macroscopicamente com aspecto necrótico e ao microscópio como uma profunda depressão, onde houve grande quantidade de acérvulos com setas (Figura 3a). A medida que se afasta do centro da lesão, diminui a quantidade do fungo. Na região do mesófilo da vagem, encontram-se massas de conídios. Estes estavam envolvidos por uma grande quantidade de mucilagem o que impossibilitou, na maioria dos casos, fazer uma descrição detalhada da superfície dos mesmos. Não foram observados conídios germinando na região de depressão. Na amostra nº 2 foram observados conídios em anastomoses nos acérvulos (Figura 3b). Com uso das diferenciadoras, verificou-se que nas amostras nº 1 e 2, estavam presentes isolados de *C. lindemuthianum* correspondentes às raças 81 e na amostra nº 3, um isolado da raça 89.

Na região adjacente (Figura 2), estômatos bem conservados foram observados, assim como os tricomas da planta. A quantidade de hifas foi mínima, quando comparada à quantidade de conídios. Os conídios na superfície da epiderme estavam germinando, formando apressórios. Estes conídios apresentavam-se lisos e sem mucilagem. Na amostra nº 2 houve grande invasão do fungo ao redor dos tricomas. Outros fungos, bem como bactérias, também foram encontrados no material proveniente do campo, nos arredores da lesão principal da planta.

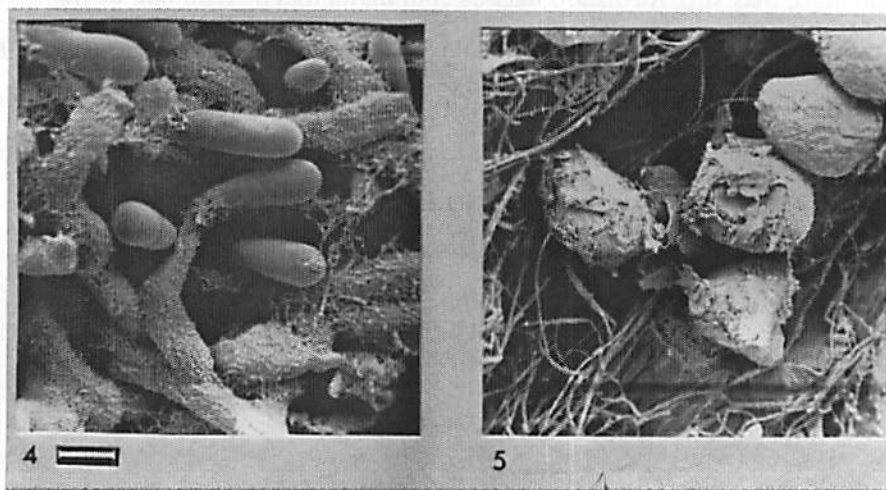
1.3.2 Isolados

Nas amostras dos isolados, as vagens não apresentaram diferentes regiões (amostras nº 4 e 5). Nestas amostras foram encontrados muitos conídios com mucilagem (Figura 4). Os acérvulos apresentaram-se característicos da espécie e similares aos encontrados nas amostras obtidas do substrato natural. A dispersão do fungo foi homogênea ao longo de toda a vagem. Os estômatos estavam visíveis embaixo das hifas. Não foram encontrados conídios

germinando, mas sim, formando massas com muita mucilagem, que os mantinha próximos (Figura 5). Como a mucilagem foi muito bem conservada no processamento da amostra, em alguns casos não foi possível a visualização dos conídios em detalhe. Na amostra nº 5 foram encontrados poucos conídios com tamanho inferior ou iniciando o processo de germinação.



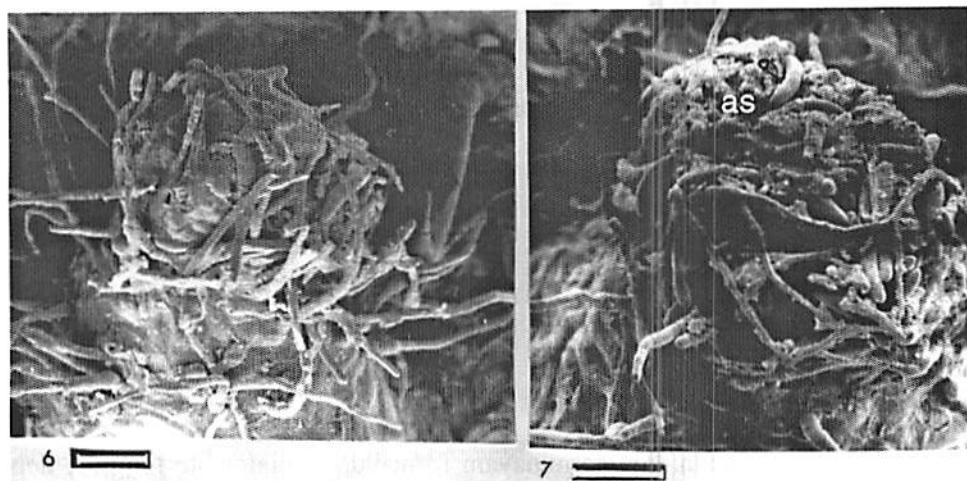
FIGURAS 1-3 Amostra nº 2. 1- Depressão da lesão, acérvulos com setas. Barra: 200µm. 2- Tecido adjacente à depressão de hipersensibilidade, conídio germinando (c), outro fungo (o), aumento total: 5.270X. 3 (a) Acérvulo com setas e tricoma (t), Barra: 20µm. 3 (b) Detalhe da Figura 3a, conídios em anastomoses na base do acérvulo. Barra: 15µm.



FIGURAS 4-5 Amostra n^o4. 4- Conídios com mucilagem. Barra: 5 μ m. 5. Agrupamento de conídios com mucilagem. Só a mucilagem foi aparente no MEV. Barra: 50 μ m.

As demais amostras (n^o 6, 7, 8 e 9) vindas do laboratório eram originárias de um mesmo isolado (531), porém comportaram-se de forma diferente. Os isolados 531 e 531-5 foram culturas diferentes (o 531-5 foi um isolado de um ascósporo do 531).

Os peritécios produzidos de forma espontânea sobre folhas, em meio de cultura (amostra n^o 6), quando imaturos, apresentavam-se como um corpo arredondado, coberto por hifas (Figura 6). À medida que amadureciam verificava-se a exposição dos ascósporos (Figura 7). Ascósporos não foram observados, provavelmente por encontrarem-se no interior do peritécio, uma vez que não foi efetuado esmagamento dos mesmos. Os ascósporos foram encontrados com maior frequência no formato alantóide (Figura 8).



FIGURAS 6-7 Amostra nº 6. 6- Peritécio imaturo. Barra: 20µm. 7- Peritécio maduro, ascósporo (as). Barra: 20µm.

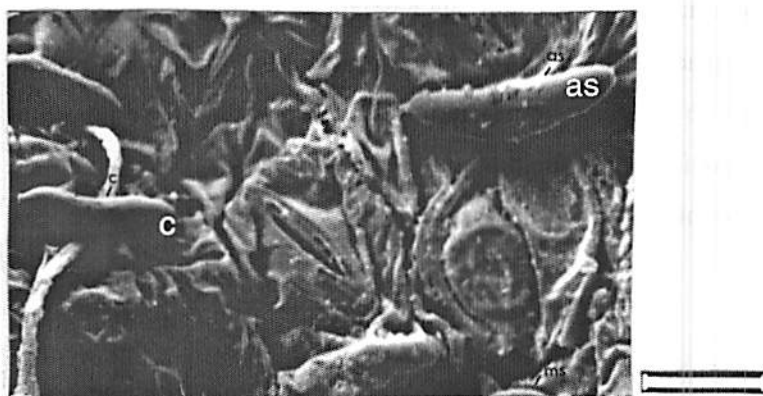


FIGURA 8 Amostra nº 6. Ascósporo (as) e conídio (c). Barra: 10 µm.

As amostras nº 7, 8 e 9 apresentaram diferentes tamanhos de conídios (Figura 9). São considerados de tamanho normal em torno de 4,14µm de largura e 11,74µm de comprimento, em média. Os microconídios, sem germinar, tinham, em média, 1,33 x 3,48 µm e, quando em germinação, o tamanho foi de 2,30 x 4,6µm. Também foram encontradas, na amostra nº 7, estruturas com características de escleródios.

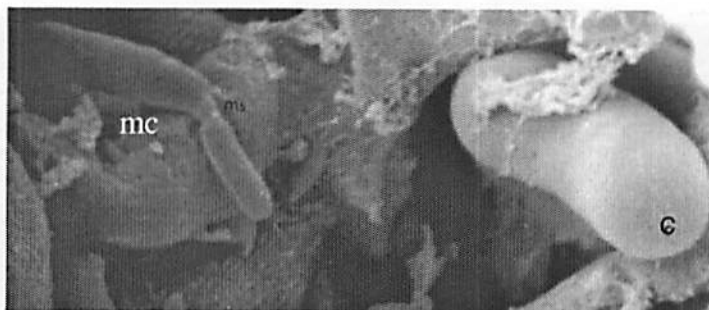


FIGURA 9 Amostra nº 7. Conídio (c) e microciclo de esporulação (mc) a.t.: 10.550 x.

Os microconídios germinavam formando inicialmente tubos e, depois, hifas delgadas. Foram encontrados conídios em anastomose e com grandes aumentos observam-se cicatrizes em um ou ambas as extremidades dos conídios, mas não foram encontrados germinando. Na amostra nº 9 (membrana de nylon passada acima do isolado 531-5 esporulando em meio M₃), foram encontradas grandes quantidades de conídios em anastomoses, conídios grandes e pequenos com cicatrizes e conídios produzidos por outros conídios (microciclo de esporulação). Microconídios e microciclo de esporulação não foram encontrados em BDA.

1.4 DISCUSSÃO

Ambas as amostras apresentaram acérvulos, nos quais foram encontrados conídios. Os conídios estavam envolvidos com uma grande massa mucilaginosa, provavelmente protegendo-os. A mucilagem, aparentemente tem alguma matriz que foi conservada pelo processo de fixação utilizado. Sabe-se que esta mucilagem, no gênero *Colletotrichum*, além de ser vantajosa, em termos de sobrevivência por evitar dessecação por exemplo, pode também conter substâncias auto-inibidoras da germinação (Nicholson, 1992; Mananhddhar *et al.*,

1995). Isto explicaria a ausência de conídios germinando nos acérvulos. A existência de dormência facilita que os conídios sejam disseminados pelo vento, respingos de água, material propagativo, formigas e outros insetos (NagRaj, 1981; Mananhdhar *et al.*, 1995), enquanto a mucilagem vai sendo retirada e estes podem germinar, como observado nos arredores da lesão causada pelo fungo, nas amostras vindas da natureza. Nestas amostras, os conídios germinados e formando apressórios foram observados afastados dos acérvulos, começando novos ataques à planta em pontos sadios desta.

Trabalhos anteriores mostram que os apressórios são formados na superfície da epiderme das plantas, e é a primeira estrutura a ser formada na natureza quando vai ocorrer o ataque por este fungo (Aist, 1981; Oshero & May, 2001). Outros organismos foram encontrados, o que era esperado, uma vez que no campo ocorrem interações entre diferentes espécies de seres vivos. Porém, na lesão, somente se encontravam acérvulos e conídios de *Colletotrichum*. Nestas regiões, os acérvulos encontravam-se embaixo da epiderme e, provavelmente, as setas dos acérvulos teriam a função de rompe-la, permitindo a exposição dos conídios ao meio ambiente. Quando foi possível ver os conídios, a epiderme estava desagregada e o mesófilo exposto mostrava então, grupos de conídios com mucilagem e em longas cadeias e em anastomoses. Como este material vinha do campo, e não sabe-se exatamente a data de inoculação e também quantos conídios iniciaram o processo de infecção, é fácil deduzir que os acérvulos avaliados têm diferentes idades. Esse fato explica as diferentes aparências da epiderme e do mesófilo, uma vez que as amostras foram fixadas como encontradas, sem quebras e com o mínimo de manipulação.

O tecido que encontra-se nas depressões causadas pela morte celular da planta foi característico da reação de suscetibilidade ao patógeno (Greenberg, 1997). As vagens de feijoeiro inoculadas em laboratório permitiram o

crescimento do fungo de forma uniforme, uma vez que não houve interação entre a planta e o fungo. O pedaço da planta (vagem) no qual foi feita a inoculação estava morto e não houve reação de resposta da planta ou efeito do fungo de forma diferenciada.

Quando comparam-se os acérvulos das vagens do substrato natural e a esporulação nas vagens autoclavadas, observa-se que as características gerais de esporulação apresentaram-se como descrito na literatura (Sutton, 1992). Considerando as descrições feitas por Sutton (1966), *C. lindemuthianum* é um exemplo de fungos que forma acérvulos com desenvolvimento pulvinato. No entanto, a maioria dos trabalhos realizados nesta espécie utilizou microscopia eletrônica de transmissão e as comparações não são exatas. As observações realizadas neste trabalho, com acérvulos de diferentes idades de desenvolvimento, indicam que, aparentemente, o desenvolvimento foi do tipo pulvinado (ruptura das células do hospedeiro por força mecânica). No material inoculado sobre as vagens mortas e em alguns acérvulos com aparência de estágio avançado de esporulação, o aspecto hipostromático foi aparente. Isto ocorre quando enzimas do fungo degradaram células do hospedeiro. Sutton (1966) cita que o aspecto hipostromático é característico de outros *Colletotrichum*, como *C. graminicola* e não *C. lindemuthianum*.

No material que veio de meio de cultura, não foram encontrados acérvulos característicos e sim esporos com as diferentes características do material vindo de um acérvulo. Isto, provavelmente, deve-se ao fato de não terem sido tomadas amostras completas e, sim, tocada a superfície da colônia com a membrana de nylon.

Em apenas uma amostra foram encontradas estruturas similares a escleródios e sabe-se que, apesar desta espécie poder formar este tipo de estrutura, da é pouco freqüente (NagRaj, 1981). Provavelmente, a presença de escleródios se deve mais a circunstâncias ambientais do que a características de

um isolado específico.

Alguns isolados do laboratório (531 e 531-5) apresentaram microciclo de esporulação somente em meio MA ou M₃ e não em BDA. As culturas originais, e após a micromanipulação conservaram estas características. Isto indica que esta forma de esporulação provavelmente é estimulada por fatores nutricionais e algumas características no genótipo do fungo, uma vez que os outros isolados utilizados não apresentaram, em nenhuma circunstância, o microciclo de esporulação.

Os conídios apresentaram tamanho médio próximo ao descrito na literatura (Sutton, 1992; Roca, 1997). Quanto aos microconídios, poderia se questionar a ocorrência de contaminação, no entanto, utilizaram-se culturas monospóricas. Os resultados de transferências paralelas para M₃, MA e BDA mostraram que o comportamento dimórfico foi dependente do meio de cultura e ocorreu em um isolado. Isto já foi verificado também para outros fungos (Smith *et al.*, 1981; Deacon, 1997). Estudos sobre ultra-estrutura deveriam ser realizados com a finalidade de identificar diferenças ou semelhanças entre o que foi considerado conídio e microconídio. Isto porque não foram encontrados dados na literatura referentes a este assunto em *C. lindemuthianum*.

Os conídios observados em anastomose tinham aparência diferente daqueles originados do ciclo de microesporulação, permitindo inferir que as anastomoses entre conídios não seja resultado do processo de microesporulação. Os conídios em anastomose apresentaram tamanho e formas similares aos conídios livres. Quando comparam-se as amostras vindas da natureza com as do laboratório, verificou-se que na natureza existiam cadeias de conídios e no laboratório foram mais freqüentes anastomoses entre dois conídios. Isto pode ser devido a fatores como manipulação e idade da amostra, pois, não foi possível ter certeza do tempo da lesão e do início do processo de esporulação nas vagens vindas do campo. Estas anastomoses também foram encontradas no material que

não apresentou microciclo de esporulação, mais uma vez confirmando que não estão relacionadas a um fenótipo específico do isolado 531.

Houve formação de peritécios sobre as folha em meio de cultura, que facilitou a manipulação e preparação da amostra. Em hipótese alguma o substrato utilizado foi considerado como indutor da reprodução sexual, haja vista que esta ocorreu de forma espontânea, anteriormente em meio de cultura. Cruzamentos não foram propiciados para confirmar a natureza homotática das amostras, mas, aparentemente, este isolado teve comportamento homotático durante as transferências realizadas nestes experimentos.

Os peritécios, quando imaturos, apresentaram aparência similar à aquela observada com auxílio de microscopia de luz (Uecker, 1994; Roca, 1997). Entretanto, quando maduros, ocorreu degradação gradativa da parede dos ascos e somente foram observados ascósporos na parte externa. Nesta espécie, a degradação da parede do asco parece estar associada ao estágio de amadurecimento do mesmo (Roca *et al.*, 2000). Segundo Read e Beckett (1996), alguns peritécios têm uma parede delgada, sem estruturas apicais especializadas para a liberação dos ascósporos (que são liberados após a queiscência da parede dos ascos), o que coincidiria com as descrições apresentadas por Kimati e Galli (1970) e Roca *et al.* (2000). O trabalho mais completo envolvendo este tipo de estudo foi realizado por Uecker (1994), mas não incluía isolados de feijoeiro.

O comportamento pleomórfico, que inclui formação de esporos de origem assexual (mitospórica ou anamórfica), microciclo de esporulação (dimorfismo) e esporos de origem sexual (meiospórica ou teleomórfica), pode representar uma característica vantajosa, como já definido para outros fungos (Carmichael, 1981). No entanto, este comportamento só foi observado em meio de cultura, para as amostras provenientes do laboratório.

1.5 CONCLUSÃO

A forma de esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum* variou em função da origem do material observado. Na natureza, a esporulação ocorreu por meio de conídios produzidos em acérvulos, típicos da reprodução assexual. Em condições específicas de laboratório teve comportamento pleomórfico, incluindo a formação de conídios de origem assexual (mitospórica ou anamórfica), microciclo de esporulação (dimorfismo) e formação de ascósporos de origem sexual (meiospórica ou teleomórfica).

1.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: J.Wiley e Sons, 1994. 487p.

BAGAGLI, E.; VALADARES, M. C. C.; AZEVEDO, J. L. Parameiosis in the enthomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. *Revista Brasileira de Genética*, v. 14, n. 2, p. 261- 272, 1991.

BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. *Phytopathology*, v.87, p.1184-1191, 1997.

BATISTA, U.G.; CHAVES, G.M. Patogenicidade de culturas monoascosporicas de cruzamento entre racas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. *Fitopatologia Brasileira*, Brasilia, 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**. 1985. 156p. Thesis (PhD.)- Agricultural University of Wageningen, Wageningen.

BRYSON, R. J. Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*. 1990. 290p. Thesis (Ph.D.)-University of Birmingham, Birmingham.

DAY, A.W.; JONES, J.K. The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. *Genetic Research*, Cambridge, v.11, n.1, Feb. 1968

GRIFFITHS, A.J.F. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiological Reviews*, Washington, v.59, n.4, p.673-685, 1995.

GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia. Porto Alegre: UFRGS, 1990. 93p.

HASTIE, A. C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. *Genetic Research*, v. 5, p. 305-315, 1964.

HAUGLAND, R.P. Handbook of fluorescent probes and research chemicals. 6.rd.edn. Eugene-OR, USA: Molecular Probes, 1996.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v. Schrenk. 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.

KONING, A.J.; LUM, P.V.; WILLIAMS, J.M.; WRIGHT, R. DiOC₆ staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells. *Cell Motility and Cytoskeleton*, v. 25, p.111-128, 1993.

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.

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. In: LUZ, W.C. (Ed.). *Revisão anual de patologia de plantas*. Passo Fundo: Barthier, 1994. p. 229-263.

MANNERS, J.; BAMPTON, S.S. Fusion of uredospore germ tubes in *Puccinia graminis*. *Nature*, London, v.179, p.483-484, 1957.

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, 1996, Caxambu.).

OSHEROV, N.; MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, v. 199, p.153-160, 2001.

O'SULLIVAN, D. *et al.* Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetics*, v.33, p. 291-298, 1998.

PAIN, N.A. *et al.* Composition and organization of extra cellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma*. v.190, p.19-130, 1996.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.10, p.393-400, 1956.

ROBINOW, C. F. The preparation of yeast for light microscopy. In: PRESCOTT, D. M. (Ed.). *Methods in cell biology*. New York: Academic, 1975. v.11, p. 2-21,

RAVA, C.A.; PURCHIO, F. SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, n. 2. p.167-172, 1994.

ROCA M., M.G. Aspectos Citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner). 1997. 82 p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

ROCA M. M.G. *et al.* Ultrastructural aspects in perithecia hyphae septal pores of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.31, p.223-225, 2000.

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.

SCHREIBER, L.R.; GREEN JR, R.J. Anastomosis in *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, v.56, p.1110-1111, 1966. ✓

SNETSEELAR, K.M.; MIMS, C.W. Sporidial fusion and infection of mayze seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, v.84, n.2, p.193-203, 1992. ✓

STEINBERG, G. Organelle transport and molecular motors in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v.24, p. 161-177, 1998. ✓

SOUTHWORTH, E.A. Anthracnose of cotton. *Journal of Mycology*. v.6, p.100-105, 1891.

TU, J.C. An improved Mathur's medium for growth, sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Micróbios*, v.44, p.87-93, 1985.

UECKER, F.A. Ontogeny of the ascoma of *Glomerella cingulata*. *Mycologia*, New York, v.86, n.1, p.82-88, Jan. 1994.

WILCOXSON, R.D.; TUIITE, J.F.; TUCKER, S. Urediospore germ tube fusions in *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, St. Paul, v.48, p.358-361, 1958

WILHELM, S. Aerial microsclerotia of *Verticillium* resulting from conidial anastomosis. *Phytopathology*, v. 44, p. 609-610, 1954. ✓

CAPÍTULO 2

CITOLOGIA DAS ANASTOMOSES ENTRE CONÍDIOS DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Colletotrichum lindemuthianum*

RESUMO

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Citologia das anastomoses entre conídios do fungo fitopatogênico *Colletotrichum lindemuthianum*. In: _____. **Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios**. 2002. Cap. 2, p. 49-70. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.*.

Um estudo citológico foi realizado para descrever as anastomoses entre conídios em *Colletotrichum lindemuthianum*, o patógeno causador da antracnose no feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). Foram utilizadas quatro raças diferentes e três isolados para cada uma das raças. Com o uso de microscopia de luz foi determinada a frequência em que as anastomoses foram formadas. As imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmaram que as anastomoses entre conídios ocorrem também no substrato natural. O tubo de anastomose teve um tamanho médio de 1,82 x 4,04 μm . As características deste tubo permitem a conexão entre citoplasmas e a passagem do núcleo, como mostrado pela avaliação através de microscopia eletrônica de transmissão. Em poucas ocasiões foram encontrados septos. A passagem de organelas foi confirmada utilizando-se fluorocromos vitais para mitocôndrias e vacúolos, observados no microscópio de fluorescência e confocal. Embora estes fluorocromos tenham sido originalmente testados em leveduras, eles apresentaram alta afinidade para estudos desta espécie. Estas conexões celulares foram diferentes de qualquer estrutura previamente descrita em *C. lindemuthianum* e das anastomoses entre hifas.

* Comitê Orientador: Lisete Chamma Davide - UFLA (Professora orientadora), Alan E. Wheals - University of Bath-UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

ABSTRACT

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Cytology of conidia anastomoses of a plant anthracnose fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. In: _____. **Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios.** 2002. Cap. 2, p. 49-70. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.*

A cytomorphological study was done to describe the conidial anastomosis in *Colletotrichum lindemuthianum* which is the causal agent for anthracnose of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Three strains were used for each of the four different physiological races studied. Using light microscopy the frequency of the event of anastomosis was quantified. Using scanning microscopy with sporulating strains it was confirmed that anastomosis between conidia occurs in both samples, coming from nature or laboratory conditions. The anastomosis tube had an average diameter of 1.82 μm and length 4.04 μm . The size of this tube permitted the cytoplasm and nucleus passage as shown by the tube characteristics showed on transmission electron microscopy, although septa could be found occasionally. The organelles passage were confirmed using vital fluorochromes to visualize mitochondria and vacuoles using fluorescence and confocal microscopy. The fluorochromes were originally designed for yeasts, but showed high specificity with this filamentous fungi. This kind of cytoplasm connection is different of any structure described before in *C. lindemuthianum* and from hyphal anastomosis.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Alan E. Wheals - University of Bath-UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

2.1 INTRODUÇÃO

O fungo causador da antracnose do feijocero, *Colletotrichum lindemuthianum*, é descrito como um ascomiceto mitospórico e apresenta diferentes raças fisiológicas durante a fase assexuada (Rava *et al.*, 1994; Balardin *et al.*, 1997).

A forma sexual desta espécie foi encontrada poucas vezes e somente em condições de laboratório (Kimati & Galli, 1970; Batista & Chaves, 1982; Bryson, 1990, Mendes-Costa, 1996). Existem vários trabalhos tentando mostrar formas alternativas da origem da variabilidade encontrada nesta espécie. Entre elas, podem ser citadas a ocorrência de heterocários pela fusão de protoplastos (Bos, 1985), as anastomoses entre hifas (Bos, 1985; Roca, 1997), o polimorfismo cromossômico (Roca, 1997, O'Sullivan *et al.*, 1998) e o rearranjo do genoma (O'Sullivan *et al.*, 1998). Embora várias tentativas tenham sido feitas para confirmar a ocorrência de um ciclo parassexual, como descrito por Pontecorvo (1956) em *Aspergillus*, inclusive algumas modificações deste ciclo que ocorrem em outras espécies (Bagagli *et al.*, 1991), ela não tem sido completamente demonstrada em *C. lindemuthianum* (Bos, 1985; Roca, 1997).

As anastomoses entre hifas, que permitem a conexão de citoplasmas entre diferentes células das hifas, são bem conhecidas e descritas (Alexopoulos *et al.*, 1994), não sendo o mesmo caso das conexões entre conídios. Em trabalhos anteriores encontram-se descrições de estruturas semelhantes a anastomoses entre conídios de *C. lindemuthianum* e que foram chamadas de fusão de corpos (Rodentier & Hurd-Karber, 1947) ou fusão de tubos germinativos (Manners & Bampton, 1957; Wilcoxson *et al.*, 1958). O termo anastomose entre conídios foi usado em um estudo realizado com *Verticillium*, um fungo fitopatogênico presente no solo (Wilhelm, 1954; Schreiber & Green, 1966) e fusão de esporídios em *Ustilago maydis* (Snetseclar & Mims, 1992).

Porém, sabe-se que algumas espécies de *Verticillium* possuem o ciclo parassexual (Hastie, 1964; Kotlyarevskii & Levites, 1991). Para o basidiomiceto *U. maydis*, existem alguns estudos de 'cruzamentos' ou encontros, através da fusão dos esporídios e do dimorfismo desta espécie (Snetseelar & Mims, 1992). Esporídio é o nome utilizado para designar os basidiósporos dos fungos ustilaginales (basidiomicetos), sendo este último de origem sexual (Guerrero & Silveira, 1993). Em *Colletotrichum* só se encontrou a citação destas estruturas em três trabalhos sem descrições (Southworth, 1891; Uecker, 1994; Roca, 1997).

No primeiro trabalho, Southworth (1891) fez alguns desenhos do agente causal da antracnose no algodoeiro, entre os quais, um mostrando esta estrutura. Posteriormente, uma estrutura similar foi chamada de anastomose entre conídios quando encontrada em *C. lindemuthianum* (Roca, 1997). Southworth (1891), na época especulou a possibilidade de estar ocorrendo um processo de brotamento, partindo dos esporos previamente formados de *basídios*, os quais poderiam ser liberados ou ficar presos através de um delicado tubo. O segundo trabalho foi realizado por Uecker (1994) em *Glomerella cingulata* (vários hospedeiros). Nas fotografias da esporulação da fase mitospórica, ocorrida em fialides (célula conidiogênica), o autor mostrou três conídios com tubos fundidos entre eles, antes mesmo de terem sido liberados da hifa original (não fica clara a possibilidade dos conídios terem formado a hifa). Todavia, nenhum dos dois trabalhos traz explicações detalhadas. No último trabalho, realizado por Roca (1997) em *C. lindemuthianum*, várias fotografias foram mostradas e os núcleos parecem estar envolvidos em processos relacionados com o aumento da variabilidade genética da espécie.

O objetivo deste trabalho foi descrever e caracterizar as anastomoses entre conídios, mostrando as possibilidades de ocorrer passagem de organelas e troca de material citoplasmático em *C. lindemuthianum*, utilizando, principalmente, vários tipos de microscopia.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Isolados e meios de cultura

Os diferentes isolados foram obtidos de lesões em vagens de plantas de feijoeiro e estão depositados na micoteca do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, sendo mantidos em meio de cultura batata-destrose-ágar (BDA) (Tabela 1). As culturas monospóricas foram obtidas por meio de suspensões diluídas de conídios que foram espalhadas em placas com meio de cultura. Posteriormente, com auxílio de uma agulha, foram recolhidos unicamente os conídios (esporos assexuais) germinados. As culturas monospóricas foram então mantidas em meio Mathur's (M3S) modificado (Tu, 1985) a 20°C, para crescimento e esporulação.

Diferentes meios de cultura foram testados para se verificar a presença de anastomoses entre conídios. Os meios testados foram: M3S, BDA, nutriente ágar, czapek dox ágar, farinha de milho ágar e triptopano soja ágar (da Oxoid™, com exceção do M3S). Vagens de feijão autoclavadas também foram inoculadas.

2.2.2 Frequência das anastomoses

A frequência de anastomoses foi determinada em amostras contendo 3.000 conídios cada, ressuspendidos em tampão fosfato, sem nenhum processo de fixação prévio e avaliadas em microscópio de campo claro. As amostras originaram-se de sete grupos que correspondiam a corpos de frutificação assexual, coletados de uma mesma placa com dez dias de crescimento sobre vagens de feijão.

TABELA 1 Isolados de *C. lindemuthianum* com suas respectivas identificações e características.

Nº da amostra	Isolado	Raça fisiológica	Lugar de origem
00	531	0	Goiânia, GO
01	458	64	Viçosa, MG
02	466	64	Viçosa, MG
03	467	64	Viçosa, MG
04	1004	73	Madre de Deus, MG
05	1006	73	Lambari, MG
06	1012	73	Lavras, MG
07	401	81	Viçosa, MG
08	538	81	Viçosa, MG
09	1002	81	Lavras, MG
10	1023	81	Lambari, MG
11	BS	81	Bom Sucesso, MG
12	1020	2047	América Central
13	1020F	2047	América Central
14	1020Ç	2047	América Central

2.2.3 Características das anastomoses

2.2.3.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para verificar e descrever as anastomoses entre conídios durante a esporulação foram avaliadas amostras dos isolados e amostras procedentes de substrato natural no campo. Os isolados foram transferidos sobre as vagens. As

laser de Argon (458, 488nm) e laser HeNeI (543nm), no Departamento de Biologia e Bioquímica da Universidade de Bath (UK). Imagens simultâneas de campo claro e fluorescência ou confocal foram adquiridas quando necessário. Utilizou-se objetiva de imersão a óleo 63x Oil DIC Plan-Apochromat (NA 1.4).
microscopia

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As anastomoses mostraram-se como pequenos tubos emitidos de um conídio a outro (Figura 1), que permitem a conexão entre os citoplasmas dos conídios envolvidos (Figura 2). Variações foram observadas no comprimento das anastomoses, sendo a média calculada com base em vinte medições realizadas com recursos próprios do MEV foi de 4 μm de comprimento por 2 μm de largura. Algumas vezes, o comprimento chegou a 20 μm , observado no microscópio de fluorescência e não incluídos nos cálculos da média feito no MEV. Ocasionalmente, septos foram encontrados separando os citoplasma dos conídios conectados. Estes foram evidenciados tanto em contraste de fase, como com *calcufluor white* no microscópio de fluorescência e em seções de cortes no microscópio eletrônico de transmissão.

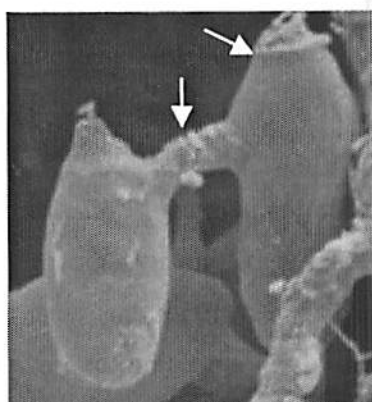


FIGURA 1 Conídios em anastomose. MEV. Setas indicam cicatrizes decorrentes da fusão dos tubos da anastomose e do nascimento (processo de conidiogêneses) dos conídios. Isolado 531. Barra = 1 μm .

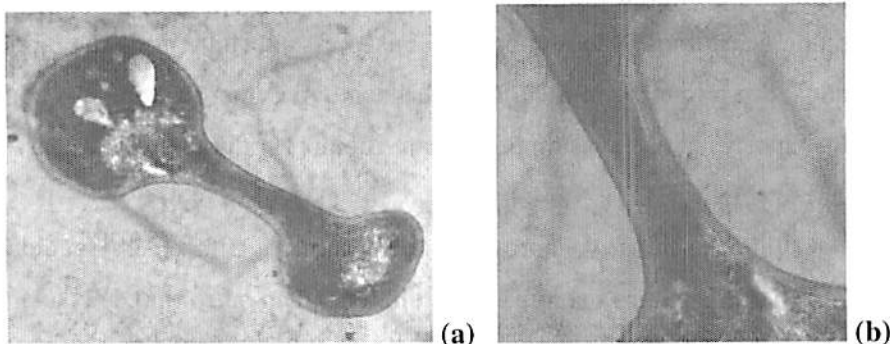


FIGURA 2 Anastomoses entre conídios. MET. Isolado 09. (a) Corte transversal de dois conídios e anastomose. (b) Detalhe de corte transversal de uma anastomose. Barra = 3 μm .

As comparações com outros dados bibliográficos foram prejudicadas pela escassez de publicações sobre este assunto. Em *Colletotrichum* (*Glomerella cingulata*) encontra-se uma citação sobre uma fotografia sem nenhuma descrição (Uecker, 1994). Mesmo no trabalho efetuado por Roca (1997), em que várias fotografias foram mostradas, é possível verificar que são as mesmas

anastomoses, porém bem curtas. Isto pode ter ocorrido pelo tamanho da amostra utilizada na oportunidade (Roca, 1997). As anastomoses em *Verticillium albo-atrum* e *Ustilago maydis* apresentam alguns aspectos morfológicos semelhantes e são, provavelmente, o mesmo tipo de estrutura. Porém, estes dois fungos apresentam poucas coisas em comum com *Colletotrichum* no que se refere ao ciclo de vida, exceto que são fungos fitopatogênicos e podem ser saprofíticos em certas ocasiões (Schreiber & Green, 1966; Snetselaar & Mims, 1992; Machado, 1994). Snetselaar e Mims (1992) comentam que o *tubo conjugativo pode ter vários tamanhos e orientações e algumas vezes podem estar conectando esporídios distantes*.

Uma estrutura bem conhecida, e que normalmente é emitida por conídios é o tubo germinativo, o qual ocorre durante o processo de germinação (Osharov & May, 2001). As características que diferenciam o tubo germinativo do tubo de anastomose são a época de emissão e o tamanho dos dois tubos. Os resultados do primeiro ensaio do experimento de microcultura em lâminas indicam ausência de anastomoses entre conídios durante o processo de germinação (Figura 3).

O tubo germinativo normalmente forma uma hifa e, em seguida, um novo micélio de uma nova colônia ou se diferencia em outro tipo de célula (Pain *et al.*, 1996), como um apressório, por exemplo (Figura 4). A não identificação das anastomoses durante a germinação, pode ter sido por causa do tamanho da amostra utilizada, a qual pode não ter sido suficientemente grande para representar a população. Em *Verticillium*, Schreiber e Green (1966) também comentam a ausência deste fenômeno durante a germinação. As condições utilizadas também podem ter influenciado, uma vez que foi utilizado meio de cultura 'completo'. Em alguns fungos, quando se quer promover o encontro entre tubos que permitem a conexão entre citoplasma de esporos, essa condição é obtida mantendo-se os esporos em meio mínimo (Day & Jones, 1968).

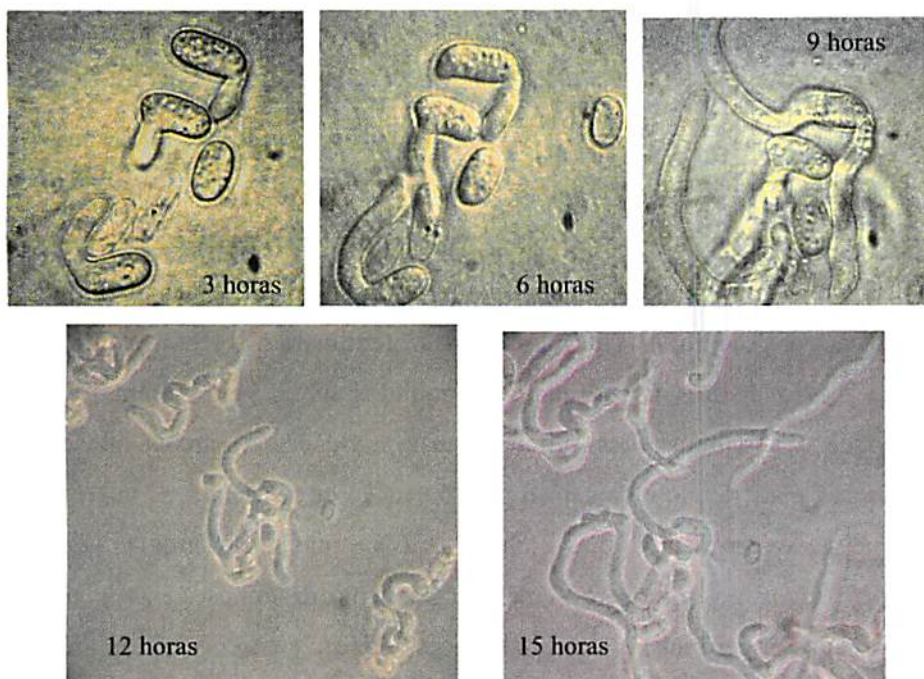


FIGURA 3 Sequências de fotomicrografias do primeiro ensaio de microcultivo. Microscópio de contraste de fase. Barra: 10 μ m.

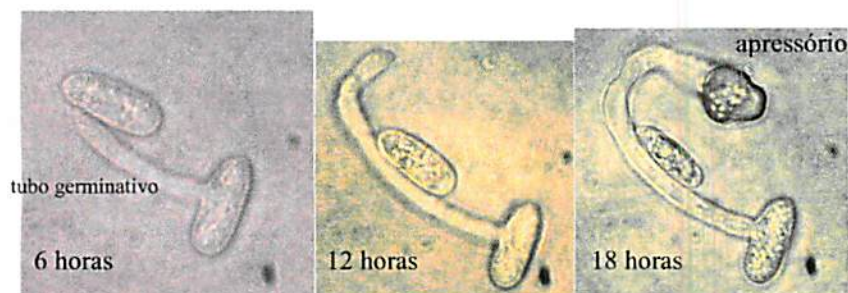


FIGURA 4 Sequência do primeiro ensaio de microcultura. Formação do haustório, 6 horas após a germinação. Microscópio de contraste de fase. Barra = 8 μ m.

O tubo germinativo também foi sempre mais largo que o tubo de anastomose (Figura 5). Isto ficou evidente no segundo ensaio do experimento de

microcultura, quando as duas estruturas foram comparadas. Pois, nestas amostras encontravam-se também conídios em anastomoses (Figura 5). Provavelmente, o termo *fusão de tubos germinativos*, utilizado por Manners e Bampton (1957) e Wilcoxson, Tuite e Tucker (1958), não é o mais adequado neste caso, apesar de tratar-se de uma espécie diferente (*Puccinia*).

Este segundo ensaio também permitiu observar diferenças no tempo de germinação; os conídios em anastomoses germinaram precocemente num período médio de três horas, enquanto conídios livres germinaram em um período de 5 a 6 horas. Essa diferença nas atividades de ambos indica um crescimento mais rápido e vantajoso para obtenção de nutrientes. É interessante notar, nesses experimentos, que, embora a fusão entre tubos *conjugativos*; em alguns *Ustilagos*, possa ter certa semelhança com as anastomoses entre conídios, quando ocorre a germinação dos urediosporos conectados. Pois, a hifa cresce a partindo do tubo de *conjugação* quando este é mais longo (Snetseelar e Mims, 1992) e não de um dos esporos, como ocorre no presente caso (Figura 5).

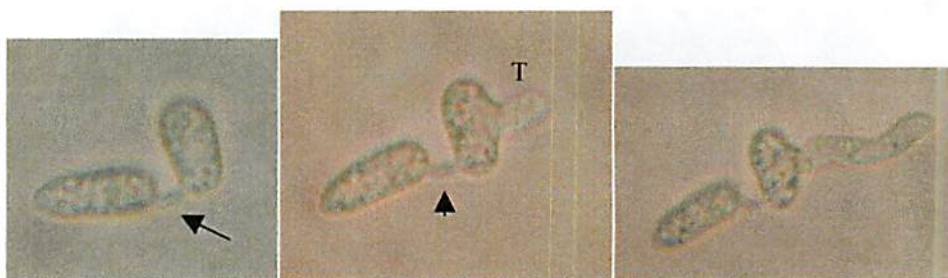


FIGURA 5 Segundo ensaio de microcultura. Intervalo de 3 horas entre fotografias. Seta= tubo de anastomoses; T= tubo germinativo. Microscópio de contraste de fase. Barra = 8µm.

Nos meios de cultura artificiais utilizados, quando as anastomoses estavam presentes, as características foram similares, assim como nas lesões de antracnose examinadas sobre vagens. Isto, além de indicar que as anastomoses não foram produto de artefatos criados pelas condições de laboratório, também mostram que elas podem estar ocorrendo na natureza. As anastomoses ocorreram unicamente após a produção de corpos de frutificação de conídios, no caso de acérvulos, quando vindo de substrato natural (meios M3S, nutriente ágar e vagens autoclavadas de feijão). BDA e czapec dox ágar foram bons meios de cultura para crescimento e formação de micélio e não para esporulação, uma vez que a quantidade de esporos produzidos foi muito inferior àquela em meio de Mathur's (M3S) e não encontraram-se anastomoses. Em triptofano soja ágar, os conídios foram produzidos em células individuais, chamadas fiálides, sem a formação de corpos de frutificação ou esporodóquios (com hifas diferenciadas como setas e mucilagem que são típicas da espécie). Neste meio de cultura também não foram encontradas anastomoses entre conídios. Em farinha de milho ágar não se obteve crescimento.

A formação de anastomoses entre conídios parece ser um processo tardio, uma vez que, para todos os isolados, estas estruturas só foram observadas após o final da esporulação. O aparecimento de conídios em anastomose, dez dias após esporulação, ocorreu em menos de 1% da população. A proporção de conídios em anastomose aumenta com o decorrer dos dias. Na Tabela 2 pode-se verificar que há quatro isolados da mesma raça e um isolado de raça diferente, o isolado 12. Depois de 15 dias do final da esporulação, a frequência de anastomoses aumenta, bem como anastomoses entre mais de um conídio (Tabela 2). No entanto, os valores não permitem fazer agrupamentos por raças ou isolados.

Anastomoses entre conídios pode ser uma forma alternativa para a ocorrência de trocas de metabólitos, organelas e material genético. A passagem

de organelas como mitocôndrias e vacúolos foi evidenciada quando utilizados corantes e microscopia de fluorescência e confocal (Figuras 6, 7 e 8). Não foram obtidas imagens com a seqüência de eventos. Entretanto, o movimento dos vacúolos e mitocôndrias foi observado e o registro desta passagem foi efetuado. Não se obteve sucesso na utilização de dupla coloração para diferentes organelas, razão pela qual a passagem de mitocôndrias e vacúolos no tubo não foi observada simultaneamente. Tampouco foi possível inferir como ocorre o movimento.

Nas condições deste experimento, o movimento do vacúolo ocorreu num período de 2 horas. Aparentemente, os vacúolos maiores ficam no conídio doador, à medida que são formados pequenos vacúolos que passam através do tubo de anastomose (Figura 6a). Estes aparecem como estruturas dinâmicas, porém não foi possível identificar, nem caracterizar um padrão de herança como demonstrado em outros fungos (Steinberg, 1998). Os vacúolos transportados entre anastomoses podem afetar o desempenho fisiológico destes isolados durante a formação de novas colônias.

TABELA 2 Percentagem de conídios envolvidos formando anastomoses entre dois, três e quatro conídios. Amostras coletadas de vagens autoclavadas, cerca de 15 a 20 dias após a esporulação.

Isolado	2 conídios	3 conídios	4 conídios
08	0,66	0,39	0,40
09	1,66	2,01	5,6
10	3,80	3,30	2,03
11	3,66	4,11	5,32
12	2,26	1,89	1,32

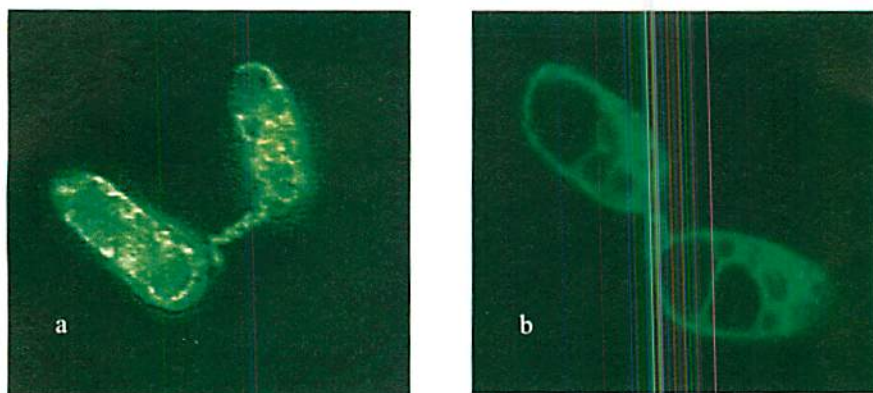


FIGURA 6 Passagem de vacúolos pelas anastomoses entre conídios. **(a)** Microscopia de fluorescência. O corante Carboxy-DFCA foi específico para o lúmen do vacúolo. **(b)** Microscópio confocal. O corante MDY-64, foi específico para o tonoplasto dos vacúolos. Barra = 5 μ m.

As conexões citoplasmáticas permitem herança extracromossômica, já descrita como fonte de variação genética em fungos (Kistler & Miao, 1992; Griffiths, 1995). A passagem de mitocôndrias ocorreu como um evento muito raro. A sua observação foi dificultada pelas condições experimentais, isto é, utilização de fluorocromo vital com material obtido de um esporódoquio (acérvulo) em um evento raro e as anastomoses entre conídios. Além disso, a focalização das mitocôndrias no tubo, com cor positiva foi muito difícil (Figura 7).

A passagem do núcleo pelas anastomoses entre conídios de *C. lindemuthianum* também foi sugerida (Roca, 1997). Nos tubos de anastomoses, os núcleos encontram-se alongados sugerindo migração, a qual deve ocorrer mediada pelo esticamento dos microtúbulos do citoesqueleto, como sugerido por Steinberg (1998) para outros fungos.

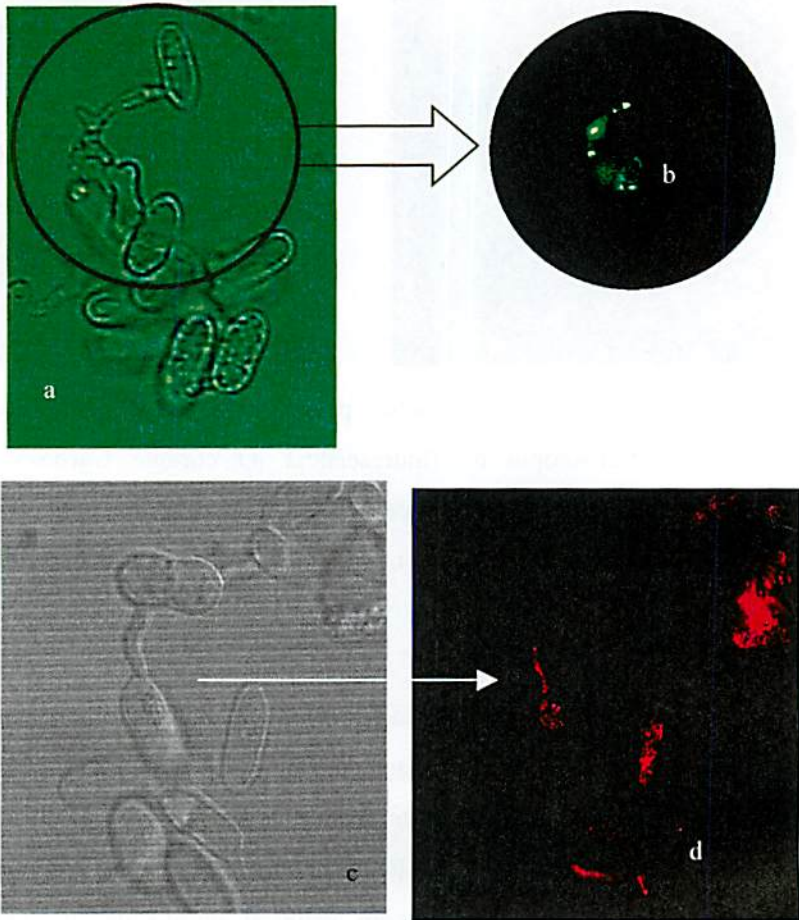


FIGURA 7 Passagem de mitocôndrias pelas anastomoses entre conídios. (a) Microscópio de contraste de fase; (b) detalhe com microscopia de fluorescência, mitocôndrias em verde com DiOC₆(3) 5µg/ml. (c) microscópio de interferência, (d) detalhe no microscópio confocal, mitocôndrias coradas de vermelho com o corante Rhodamine B. Barra = 7 µm.

Estes eventos, embora raros, afetariam o comportamento genético e fisiológico do fungo. Mesmo que os conídios sejam iguais, a possibilidade de

um incremento em metabólitos poderia conferir vantagens para sobrevivência e adaptação. A compreensão destes mecanismos contribuirá para o melhor entendimento da espécie.

Finalmente, embora um número relativamente grande de estudos tenha sido realizado em *C. lindemuthianum*, até o momento anastomoses não haviam sido bem caracterizadas para esta espécie. Isso ocorreu, provavelmente, porque a grande maioria destes estudos com microscopia foi realizada num período inferior a dez dias de esporulação.

2.4 CONCLUSÕES

- Durante a fase assexual do fungo *Colletotrichum lindemuthianum* formam-se anastomoses entre conídios, em condições de laboratório e no substrato natural.
- Anastomoses são formadas entre dois ou mais conídios.
- O tubo de anastomose caracteriza-se como uma estrutura única e diferente daquelas previamente descritas para a espécie.
- Ocorre comunicação do citoplasma e passagem de mitocôndrias e vacúolos pelo tubo das anastomoses.

2.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: J.Wiley e Sons, 1994. 487p.
- BAGAGLI, E.; VALADARES, M. C. C.; AZEVEDO, J. L. Parameiosis in the enthomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sorokin. **Revista Brasileira de Genética**, v. 14, n. 2, p. 261- 272, 1991.
- BALARDIN, R.S.; JAROSZ, A.M.; KELLY, J.D. Virulence and molecular diversity in *Colletotrichum lindemuthianum* from South, Central and North America. **Phytopathology**, v.87, p.1184-1191, 1997.
- BATISTA, U.G.; CHAVES, G.M. Patogenicidade de culturas monoascosporicas de cruzamento entre racas de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasilia, 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**. 1985. 156p. Thesis (PhD.)- Agricultural University of Wageningen, Wageningen.
- BRYSON, R. J. **Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum***. 1990. 290p. Thesis (Ph.D.)- University of Birmingham, Birmingham.
- DAY, A.W.; JONES, J.K. The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. **Genetic Research**, Cambridge, v.11, n.1, Feb. 1968
- GRIFFITHS, A.J.F. Natural plasmids of filamentous fungi. **Microbiological Reviews**, Washington, v.59, n.4, p.673-685, 1995.
- GUERRERO, R. T.; SILVEIRA, R. M. **Glossário ilustrado de fungos: termos e conceitos aplicados à micologia**. Porto Alegre: UFRGS, 1990. 93p.
- HASTIE, A. C. The parasexual cycle in *Verticillium albo-atrum*. **Genetic Research**, v. 5, p. 305-315, 1964.
- HAUGLAND, R.P. **Handbook of fluorescent probes and research chemicals**. 6.rd.edn. Eugene-OR, USA: Molecular Probes, 1996.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v. Schrenk. f.sp. *phaseoli* N. F., fase ascôgena do agente causal da antracnose do feijocero. *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.

KONING, A.J.; LUM, P.V.; WILLIAMS, J.M.; WRIGHT, R. DiOC₆ staining reveals organelle structure and dynamics in living yeast cells. *Cell Motility and Cytoskeleton*, v. 25, p.111-128, 1993.

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.

MACHADO, J.C. Padrões de tolerância de patógenos associados à sementes. In:

LUZ, W.C. (Ed.). *Revisão anual de patologia de plantas*. Passo Fundo: Barthier, 1994. p. 229-263.

MANNERS, J.; BAMPTON, S.S. Fusion of uredospore germ tubes in *Puccinia graminis*. *Nature*, London, v.179, p.483-484, 1957.

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, 1996, Caxambu.).

OSHEROV, N.; MAY, G.S. The molecular mechanisms of conidial germination. *FEMS Microbiology Letters*, v. 199, p.153-160, 2001.

O'SULLIVAN, D. *et al.* Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetics*, v.33, p. 291-298, 1998.

PAIN, N.A. *et al.* Composition and organization of extra cellular matrices around germ tubes and appressoria of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Protoplasma*. v.190, p.19-130, 1996.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.10, p.393-400, 1956.

RAVA, C.A.; PURCHIO, F. SARTORATO, A. Caracterização de patótipos de *Colletotrichum lindemuthianum* que ocorrem em algumas regiões produtoras de feijoeiro comum. *Fitopatologia Brasileira*, v.19, n. 2. p.167-172, 1994.

ROCA M., M.G. Aspectos Citológicos da variabilidade genética em *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. & Schrenck f. sp. *phaseoli* (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scribner). 1997. 82 p. Dissertação (Mestrado em Genética e melhoramento de plantas)-Universidade Federal de Lavras, Lavras.

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.

SCHREIBER, L.R.; GREEN JR, R.J. Anastomosis in *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology*, St. Paul, v.56, p.1110-1111, 1966.

SNETSEELAR, K.M.; MIMS, C.W. Sporidial fusion and infection of mayze seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, v.84, n.2, p.193-203, 1992.

STEINBERG, G. Organelle transport and molecular motors in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, v.24, p. 161-177, 1998.

SOUTHWORTH, E.A. Anthracnose of cotton. *Journal of Mycology*. v.6, p.100-105, 1891.

TU, J.C. An improved Mathur's medium for growth, sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Micróbios*, v.44, p.87-93, 1985.

UECKER, F.A. Ontogeny of the ascoma of *Glomerella cingulata*. *Mycologia*, New York, v.86, n.1, p.82-88, Jan. 1994.

WILCOXSON, R.D.; TUIITE, J.F.; TUCKER, S. Urediospore germ tube fusions in *Puccinia graminis*. *Phytopathology*, St. Paul, v.48, p.358-361, 1958.

WILHELM, S. Aerial microsclerotia of *Verticillium* resulting from conidial anastomosis. *Phytopathology*, v. 44, p. 609-610, 1954.

CAPÍTULO 3

TRANSFERÊNCIA HORIZONTAL ENTRE DUAS ESPÉCIES DE *Colletotrichum*

3.1 INTRODUÇÃO

Existem dois modos distintos para a transmissão de material genético entre indivíduos. O primeiro deles é o normalmente empregado pela maioria das espécies, denominado também de transferência vertical, ou seja, é a passagem da informação genética de geração para geração, via reprodução sexual. O segundo modo é denominado transferência horizontal ou lateral e consiste na troca de material genético entre indivíduos, não necessariamente aparentados, sem o emprego de células reprodutivas (gametas), mas sim baseada em outros mecanismos citológicos (Brygoo *et al.*, 1998; Diepeningem van, 1999; Walton, 2000).

A melhor demonstração da ocorrência de transferência lateral entre fungos poucos relacionados foi obtida no gênero *Colletotrichum* (Walton, 2000), empregando-se isolados de *C. gloesporioides*, que são incompatíveis. Porém, os mecanismos citológicos envolvidos no processo ainda não foram elucidados (He *et al.*, 1998). A compatibilidade vegetativa entre isolados de fungos é o passo inicial para ocorrer encontros entre eles (Leslie, 1993), isto ocorre, normalmente, por meio das anastomoses entre hifas (Leslie, 1993; Diepeningen, 1999). Por outro lado, a incompatibilidade vegetativa é considerada, por muitos autores, como uma barreira para a transferência horizontal (Saupe, 2000).

Para o gênero *Colletotrichum*, a ocorrência de polimorfismo cromossômico tem sido demonstrada pelo emprego de técnicas de eletroforese de campo pulsado, em isolados de *C. gloesporioides*, isolados de plantas de *Stylosantes* spp. (Masel *et al.*, 1990), de plantas cítricas (Liyanage *et al.*, 1992) e, ainda, em *C. lindemuthianum* isolados de plantas de feijoeiro (Roca, 1997; O'Sullivan *et al.*, 1998; Arce-Monotoya *et al.*, 1998). Entretanto, não se sabe como e nem quais eventos citológicos estariam envolvidos na geração dessa ampla variabilidade genética relatada para as espécies (Sicard *et. al.*, 1997;

González *et. al.*, 1998; O'Sullivan *et. al.*, 1998). Também não se sabe quais mecanismos são responsáveis pelo rearranjo do genoma e se, entre estes, pode ocorrer recombinação durante a fase assexual.

No caso de *C. lindemuthianum*, agente causal da antracnose na cultura do feijoeiro, ampla diversidade tem sido relatada, o que tem sugerido a classificação dos diferentes isolados como raças fisiológicas (CIAT, 1990). Esta classificação é realizada de acordo com a habilidade de cada isolado em causar doença em diferentes cultivares de feijoeiro portadores de diferentes genes/alelos de resistência, denominadas cultivares diferenciadoras (CIAT, 1990). Por outro lado, *C. gossypii* também mostra uma extensa variabilidade genética (Silva-Mann *et al.*, 2002).

A transferência vertical em *C. lindemuthianum* (Kimati & Galli, 1970; Bryson, 1990; Roca, 1997) e *C. gossypii* (Edgerton, 1909; Magallanes, 1998) tem sido observada em condições de laboratório, porém como um processo instável. Entretanto, acredita-se que deva existir, em condições naturais, alguma forma de recombinação genética que possa explicar tão expressiva variabilidade, até então relatada (Brygoo *et al.*, 1998). Dessa maneira, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de investigar a possível existência de transferência horizontal entre diferentes isolados de *Colletotrichum*. Para isso, empregaram-se marcas de PCR, fenotípicas e o monitoramento de eventos citológicos durante o processo de esporulação envolvendo a formação de anastomoses entre conídios, as quais possivelmente participam do processo investigado.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Meios de cultura e isolados

Foram empregados quatro isolados de *Colletotrichum*, sendo três de *C. lindemuthianum* (07, 12 e H) e um de *C. gossypii* (G). Os isolados 07 e 12 são

selvagens e correspondem às raças fisiológicas 81 e 2047, predominantemente encontradas nas regiões sul de Minas Gerais (Brasil) e América Central, respectivamente. O isolado H (modificado geneticamente) é portador do gene *hgh* que confere resistência a hygromicina B e foi fornecido pelo grupo de pesquisas do Dr. Bernard Dumas (Universidade de Toulouse – França, Dumas *et al.*, 1999). O isolado ‘G’ foi empregado por ser diferente, em várias características, do isolado H (tamanho e formato do esporo, cor da colônia, patogenicidade ao feijoeiro e não resistência à higromicina), auxiliando na identificação de possíveis recombinantes.

Os experimentos foram realizados utilizando-se culturas monospóricas obtidas com auxílio de micromanipulador acoplado ao microscópio. As culturas foram mantidas e crescidas em meio M3S (Tu, 1985), sólido ou líquido, à temperatura de 20°C e fotoperíodo de 12 horas.

3.2.2 Definição das raças fisiológicas

A determinação das raças fisiológicas dos isolados foi efetuada de acordo com metodologia apresentada por Menezes e Dianese (1988). Para avaliar a patogenicidade dos isolados ao feijoeiro, foi acrescentada a cultivar Carioca-MG às doze cultivares diferenciadoras sugeridas pelo CIAT (1990).

3.2.3 Número de núcleos nos conídios

O número de núcleos presentes nos conídios foi contado empregando-se amostras das colônias recém-esporuladas, utilizando-se o fluorocromo DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole) e visualização em microscópio de contraste de fase e fluorescência (Haugland, 1996). As suspensões de conídios em tampão fosfato foram aderidas às lâminas após secagem ao ar, permeabilizadas, utilizando-se triton 2% por 20 minutos e lavadas em tampão fosfato. A solução com DAPI (300nm) foi adicionada diretamente na lâmina e deixada por, pelo menos, 20

minutos no escuro.

Para visualização dos núcleos corados com DAPI foi utilizado um microscópio de fluorescência Olympus, com filtro de excitação ultravioleta (UG-1), espelho dicromático de 400nm e filtro de barreira de mais de 435nm. As imagens foram adquiridas com uma câmera digital Nikon CoolPix 950 (1.600 x 1.200 pixels no máximo de resolução).

3.2.4 Análises genéticas e PCR

Foi promovido o encontro entre os isolados 'G' e 'H', para confirmar compatibilidade vegetativa, transferindo-os para os extremos da placa de petri com M3S. Estes foram deixados a crescer em condições de temperatura e luz controladas e avaliada a região central da placa para verificar o encontro entre os isolados.

Os formatos dos conídios foram definidos em relação ao comprimento e largura. Estes valores foram obtidos acoplando-se uma ocular OSM no microscópio e medidos pelo menos 20 conídios, para calcular a média dos isolados utilizados.

Com a finalidade de propiciar o encontro entre os isolados, estes foram combinados para 'cruzamento 2 a 2'. Para isso, 100µl de uma suspensão conidial de cada isolado foram adicionados a outros 100µl da suspensão conidial de outro isolado, numa concentração de 10^6 conídios/ml, até serem obtidas todas as combinações possíveis. Estas misturas conidiais foram inoculadas em placas contendo meio M3S sólido por um período de trinta dias (placas de 5cm de diâmetro), quando procedeu-se ao isolamento de acérvulos individuais. Suspensões conidiais preparadas partindo de cada acérvulo foram observadas em microscópio de contraste fase e, em seguida, inoculadas em placas contendo meio M3S+higromicina B (438µg/ml) com cinco repetições. As colônias sobreviventes foram transferidas durante algumas gerações. Cada geração

proveniente da mistura de conídios foi denominada geração/transferência. Por exemplo, as colônias obtidas a partir de acérvulos individuais foram denominadas transferência A e as demais gerações/transferências foram identificadas em ordem alfabética crescente (B,C...).

Uma vez isolados, os conídios foram transferidos individualmente para meio M3S sólido ou líquido (TU, 1985) e deixados para crescer. As culturas no meio líquido foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, até formar um fino filme de micélio (três dias aproximadamente). Destas culturas foram retiradas pequenas quantidades de micélio, com auxílio de uma pinça, para obter o molde de DNA e realizar PCR.

As pontas de hifas foram incubadas num mini-tubo para PCR com 5µl de água millipore, durante três minutos, à temperatura de 91°C no termociclador. A seguir o mini-tubo foi deixado numa caixa de isopor com gelo até esfriar. Foram coletados 4 µl do sobrenadante e colocados na mistura de reação que estava esperando pronta no frio. Foram utilizados primers baseados em seqüências de DNA para reconhecimento de seqüências do plasmídeo de resistência à higromicina pAN7-1 (*hphr*), indicados na Tabela 1.

TABELA 1 Seqüência de bases dos primers empregados nas reações de PCR e referências.

Primer	T _m °C	5' - 3'	Referência
<i>hphr1</i>	60	GCA GCC GGT CGC GGA GGC CAT GG	PUNT <i>et al.</i> , 1987
<i>hphr2</i>	62	CGC TGC GGC CGA TCT TAG CCA GAC	PUNT <i>et al.</i> , 1987
<i>hphr6</i>	57	CGC CCG GAG CCG CGG CGA TCC TGC	PUNT <i>et al.</i> , 1987

O total da mistura de reação foi 25µl que continham 0,15µl de *Taq* polimerase com 1,5 unidade, 2,5µl de tampão de reação 10x, 1,5µl de MgCl₂ 25mM, 0,5µl de dNTPs 10mM, 2µl do primer A 10pM, 2µl do primer B 10pM, 4µl do sobrenadante do micélio ou 0,5µl do plasmídeo (10ng) e água millipore para completar o volume.

As condições de reação foram: a desnaturação a 91°C por 30 segundos; o anelamento a 55°C durante o tempo de um minuto; a amplificação a 72°C por 70 segundos, repetida por 35 ciclos; um último ciclo de 10 minutos a 72°C e outros 10 minutos a 4°C. Os ciclos de amplificação foram realizados empregando-se um termociclador de minitubos individuais de PCR (MJ Research thermocyclers – GRI). Os produtos de PCR foram colocados em géis de agarose 2,5 %. Os géis foram posteriormente corados com brometo de etídio (1µg/ml) e visualizados sobre transiluminador de luz ultravioleta. Todos os experimentos com PCR foram realizados no Laboratório de Microbiologia Patológica do Departamento de Biologia e Bioquímica da Universidade de Bath (Bath-UK).

3.3 RESULTADOS

Os encontros promovidos entre os isolados H e G permitiram verificar que ocorre incompatibilidade vegetativa entre os micélios de ambas as colônias, quando os isolados foram estimulados a encontrar-se após a inoculação nos extremos da placa de petri.

O monitoramento das suspensões no microscópio de fase permitiu observar a formação de anastomoses entre dois ou mais conídios em alguns dos acérvulos. Dentre essas anastomoses, foi possível identificar algumas com aspecto envelhecido. Estas anastomoses ocorreram nos encontros promovidos

por meio da mistura de conídios.

Para verificar o número de colônias resistentes à higromicina, foram inoculadas suspensões de conídios com uma concentração de $1,025 \times 10^6$ conídios/ml. Destas, uma média de 225 sobreviveram.

Das 225 colônias (transferência A) crescidas em meio M3S+Hygromicina foram selecionadas 47, das quais 37 foram transferidas para meio M3S sólido e as demais para meio M3S líquido, denominadas então transferência B. Das 37 colônias mantidas em meio sólido, 29 apresentaram cor cinza (mistura de rósea e preto), enquanto que apenas uma, dentre as dez mantidas em meio líquido, apresentou essa mesma cor (Figura 1).

As dez colônias em meio sólido e aquela em meio líquido apresentando cor rósea mais intensa foram selecionadas para serem estudadas com maiores detalhes. Estas colônias foram transferidas e avaliadas durante sucessivas gerações/transferência. As características morfológicas e genéticas dos diferentes isolados e transferências são apresentadas nas Tabelas 2 a 5.

Verifica-se (Tabela 2) que a primeira transferência (A) proveniente do isolamento de acérvulos produzidos com base na mistura conidial de H+G apresenta conídios de formato alongado e resistência à higromicina, características de G e H (Figura 2, Tabela 3), respectivamente. Por outro lado, a transferência A apresenta cor branca, que é distinta tanto de H (preta) quanto de G (rósea).

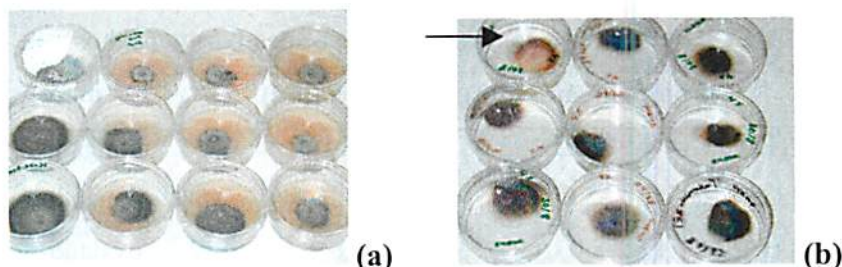


FIGURA 1 Transferência B. (a) Meio M3S sólido; (b) M3S líquido.

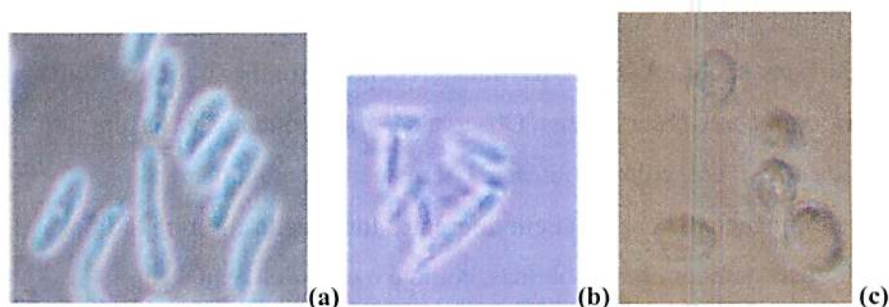


FIGURA 2 Conídios em contraste de fase. (a) Isolado da transferência B em meio líquido; (b) isolado G e (c) isolado H. Barra: 8 µm.

TABELA 2 Características genéticas e morfológicas empregadas na diferenciação dos isolados nas diferentes transferências.

Identificação	Resist. Higrom.	Cor	Conídios
H	+	Preta	Oval
G	-	Rósea	Alongado
H+G	*	Cinza	Oval + Alongado
A	+	Branca	Alongado

H e G correspondem aos isolados de *C. lindemuthianum* e *C. gossypii*, respectivamente, utilizados como 'parentais', H+G a mistura de conídios dos isolados H e G; A representa as colônias obtidas do isolamento de acérvulos individuais produzidos com base na mistura de conídios H+G; + e - representam resistência e susceptibilidade à higromicina B, respectivamente e * indica ausência de avaliação.

TABELA 3 Diferentes formatos de conídios e respectivos tamanhos.

Isolado	Comprimento (μm)	Largura (μm)	C/L	Formato
Control (12)	13,55	5,14	2,63	alongado
Parental G	15,0	5,8	2,58	alongado
Parental H	8,0	5,8	1,2	ovalado

Os resultados observados durante as transferências B e C (Figura 2, Tabela 4) crescidas em meio M3S+Higromicina mostraram a ocorrência de segregação para a cor. A partir da transferência A (branca) foram formadas colônias B, com cores preta e rósea. Observa-se, ainda, que nos casos em que foi determinada a cor das colônias crescidas em meio contendo higromicina (C), houve predominância da cor preta em diferentes tonalidades. Porém, colônias de cor cinza e rósea também foram obtidas, como é o caso de C9, n^o17.

Estudos mais detalhados foram realizados apenas para aquela colônia de cor rósea/cinza, selecionada em meio líquido durante a fase B (chamado de isolado N, Tabela 5). Neste caso, avaliações foram estendidas até a fase G, correspondendo a sétima geração de transferências. Observa-se que, ao longo das transferências, foram alterados os cultivos em meio M3S na presença e ausência de higromicina. Isso possibilitou obter após cinco gerações de transferências (E) um isolado capaz de causar doença em plantas de feijoeiro (diferente do parental H e G), de apresentar cor rósea como o parental G (Figura 3) e crescer em meio com higromicina como o parental H. Em adição, obtiveram-se ainda, os resultados de amplificação da reações de PCR, os quais mostraram a formação de bandas correspondentes à marca do isolado H (Figura 4).

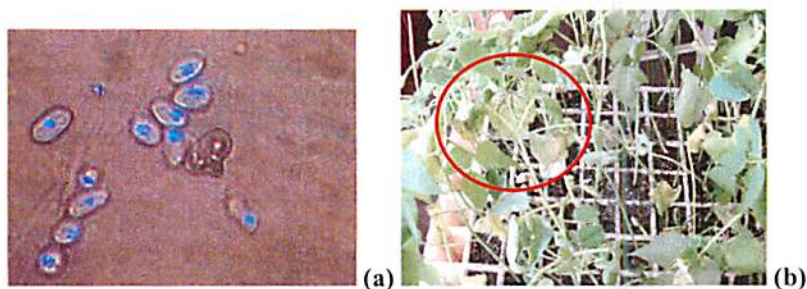


FIGURA 3 Algumas características do isolado N. (a) Formato dos conídios na transferência C, Barra: 15 μ m; (b) Sintomas de antracnose na transferência E.

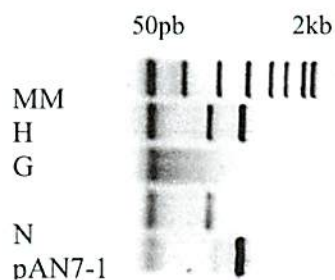


FIGURA 4 Resultados de PCR com os primers *hphr2-hphr6*. H: isolado parental H; G: isolado parental G; N: isolado N na transferência B em meio líquido; pAN7-1: plasmídeo de transformação com o gene de resistência à higromicina, controle positivo.

TABELA 4 Transferências em meio sólido. Transferências B na ausência de higromicina e C na presença e ausência de higromicina.

Transfer.	N°	Cor		Transfer.	N°	Cor da colônia	
		M3S				M3S	M3S+Higrom.
B1	1	rósea		C1	1	rósea	*
	1	preta			1	*	preta
	2	preta int.			2	cinza	*
B2	3	preta int.		C2	3	cinza	*
	3	preta int.			3	*	preta
	4	rósea			4	rósea	*
	4	preta			4	cinza	*
B3	5	preta		C3	5	rósea	*
	6	preta			6	*	preta
	6	preta int.			6	cinza	*
B4	7	rósea		C4	7	rósea	*
	7	preta			7	*	preta
	8	preta int.			8	cinza	*
B5	9	rósea		C5	9	rósea	*
	9	preta			9	*	preta
	10	preta int.			10	cinza	*
B6	11	preta		C6	11	*	preta
	11	rósea			11	perdeu	perdeu
	12	preta int.			12	cinza	*
B7	13	rósea		C7	13	rósea	*
	13	preta			13	*	preta
	14	preta int.			14	cinza	*
B8	15	rósea		C8	15	rósea	*
	15	preta			15	preta	*
	16	preta int.			16	preta	*
B9	17	rósea		C9	17	rósea	*
	17*	preta			17*	*	cinza
	18	preta int.			18	cinza	*
B10	19	rósea		C10	19	rósea	*
	19	preta			19	*	preta
	20	preta Int.			20	preta	*

B1...B10 correspondem às 10 colônias selecionadas em meio sólido; N°1...20 correspondem às diferentes transferências, por exemplo, de B1 foram feitas três transferências para placas; C1; C1...C10 correspondem às respectivas transferências derivadas de B1 a B10; preta int.= área de interseção entre o preto e o róseo (Figura 1a) e cinza= mistura de preto + rósea; * ausência de avaliação.

TABELA 5 Dados das transferências do isolado selecionado e transferido a meio líquido. Isolado chamado de N.

Repic.	M3S	+ H	Cor	PCR	Conídios
A	/	+	-	/	/
B	+	/	preto/ rósea	+	alongados/uninucleados
C	/	+	preto/ rósea	/	intermediários/uninucleados
D	+	/	preto/ rósea	/	/
E folha	/	/	lesão	/	/
F	+	+	rósea	/	alongados
G	/	+	rósea	/	alongados

-: ausência de crescimento; + crescimento, /: ausência de avaliação

3.4 DISCUSSÃO

A observação da formação de anastomoses serviu como indicio para sugerir que, fisicamente, é possível ocorrer transferência horizontal. No entanto, não foram avaliados os formatos dos conídios que faziam parte das anastomoses, e que permitiriam identificar se as anastomoses foram formadas por conídios de isolados diferentes. Na época em que estas foram observadas, podia ter ocorrido germinação das anastomoses e estes 'novos indivíduos' terem esporulado novamente (30 dias). A existência de anastomoses com aspecto envelhecido pode ter sido devido a ocorrência de combinações incompatíveis ou quebras de anastomoses mais longas com passagem de material citoplasmático (verificado no microscópio de contraste de fase). Esse fato pode indicar, mais uma vez, que houve tempo suficiente para algumas anastomoses entre conídios terem

germinado antes da formação de mais corpos de frutificação ou mesmo com mais formação destes.

Os isolados foram incompatíveis quanto à formação de anastomoses entre hifas (resultados dos encontros promovidos através das transferências nos extremos das placas), fornecendo mais uma evidência de que algum tipo de compatibilidade poderia ocorrer só por meio de anastomoses entre conídios. Sabe-se também que, por meio de fusão de protoplastos ou de anastomoses entre hifas, onde a incompatibilidade ocorre após fusão, pode ocorrer heterocariose entre alguns isolados de espécies diferentes (Hansen & Smith, 1932; Uchida *et al.*, 1958; Hastie, 1973).

A obtenção da geração A ocorreu por meio de suspensões/diluições que poderiam ter levado, por exemplo, dois conídios em anastomoses. Nesta geração poderia ainda ter ocorrido transferência por meio de anastomoses entre hifas quando da formação dos corpos de frutificação. Porém, é pouco provável, uma vez que os isolados foram incompatíveis vegetativamente.

Na transferência B, observou-se segregação rápida dos dois fenótipos parentais, isto é, na mesma placa formaram-se setores concêntricos com os dois fenótipos (Figura 1). No entanto, as gerações seguintes do isolado N (o único avaliado) se mostraram mais uniformes quanto à cor, sempre uninucleados (com menos de dez dias de cultura). As mudanças que ocorreram foram de transferência para transferência e em função da presença ou não de higromicina, por exemplo (Tabelas 4 e 5). O isolado H era preto e resistente à higromicina. Esta característica foi predominante no isolado N, quando o meio continha higromicina nos dois primeiros ciclos de crescimento. Na ausência desta, a colônia N era rósea (nos dois primeiros ciclos de vida), característica do isolado G, que cresce muito mais rápido do que o isolado H em M3S. Após os dois primeiros ciclos de vida, a cor manteve-se de forma constante até as últimas avaliações realizadas. O isolado G ocupa toda a placa em dois dias, enquanto o

isolado H demora de sete a dez dias.

Na transferência F (Tabela 5), tem-se uma colônia de coloração rósea, produzindo conídio de formato alongado e com habilidade para sobreviver em meio contendo higromicina e ainda infectar plantas de feijoeiro. A associação dessas características em um único indivíduo só poderia ocorrer da recombinação dos dois parentais, uma vez que as características apresentadas em F encontram-se separadas nos dois isolados H e G (Tabela 6). Considerando ainda que as colônias foram obtidas de corpos de frutificação ou esporodóquios individuais e que os conídios em F eram uninucleados. Descarta-se a possibilidade de heterocariose.

Vale a pena ressaltar que, embora um recombinante entre H e G tenha sido obtido, este não foi avaliado durante muitas gerações quanto a estabilidade fenotípica, nem tampouco foram efetuados estudos da patogenicidade do referido recombinante em plantas de algodoeiro. Dessa maneira, há necessidade de se prosseguir na avaliação desse recombinante para verificar sua estabilidade ao longo do tempo. Isto é, permanecerá este recombinante um isolado diferente de H e G ou segregações sucessivas ocorrerão para a recuperação dos tipos selvagens? Se forem considerados os rearranjos de genoma que, aparentemente, estão ocorrendo nesta espécie é de se esperar que, sem pressão de seleção, estes recombinantes sejam instáveis e tendam a desaparecer, sendo mantidas as características favoráveis de um dos parentais.

Finalmente, deve-se considerar que ainda existem mecanismos que ocorrem durante a fase assexual dos fungos, os quais permitem variações genéticas e que não foram explicados de forma clara. Alguns destes são variações do ciclo parassexual, como paramiose e transformação nuclear (Hastie, 1967; Bagagli *et al.*, 1995; Griffiths, 1995; He *et al.*, 1998).

TABELA 6 Características fenóticas dos parentais 'G' e 'H' e o isolado 'N'.

Isolado	M3S	+ H	Cor	PCR	Doença	Conídios
G	+	-	Rósea	/	-	Alongados
H	+	+	Preto	+	-	Arredondados
N*	+	+	Rósea	+	+	Alongados

* transferência na fase C; + crescimento ou resultado positivo; - ausência de crescimento ou resultado negativo; ausência de resultado.

3.5 CONCLUSÃO

Durante a reprodução assexual ocorrem mecanismos que permitem a troca de material genético entre isolados incompatíveis de *Colletotrichum lindemuthianum* e *C. gossippy*, produzindo novos fenótipos.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCE-MONTOYA, M.; SÁNCHEZ-GARZA, M.; SIMPSON, J. Polimorfismo en el cariotipo molecular de aislados mexicanos de *Colletotrichum lindemuthianum*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, v. 16, p. 110, 1998.

BAGAGLI, E. *et al.* Genetic recombinants in *Trichoderma pseudokoningii* (Rifai) without typical parasexuality. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1132-1134, 1995.

BRYGOO, Y. *et al.* Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Ed.). *Molecular variability of fungal pathogens*. Wallingford: CAB International, 1998. p. 133-148.

BRYSON, R.J. Sexual hybridisation and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*. 1990. 285p. Teses. (Ph.D.)-University of Birmingham, Birmingham.

CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Programa de Frijol: informe anual de 1988. Cali, 1990. p.128-129. (CIAT-Documento de trabajo, 72).

DIEPENINGEN, A.V. Horizontal transfer of genetic elements in the black *Aspergilli*. 1999. 143p. Thesis (Ph.D.)-Wageningen Agricultural University, Wageningen.

DUMAS, B. *et al.* Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.4, p. 1769-1771, 1999.

EDGERTON, C. W. The perfect stage of the cotton anthracnose. *Mycologia*, v.1, n.1, p.115-120, 1909.

GONZÁLES, M. *et al.* Characterization of Mexican Isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology*, v. 88, p. 292-299, 1998,

GRIFFITHS, A. J. F.. Natural plasmids of filamentous fungi. *Microbiology Review*, v.59, p. 673-685, 1995.

HANSEN, H.N.; SMITH, R.E. The mechanism of variation in imperfect fungi: *Botrytis cinera*. *Phytopathology*, v.22, p. 953-964, 1932.

HASTIE, A.C. Mitotic recombination in conidiophores of *Verticillium albo-atrum*. *Nature*, London, v.214, p. 240-252, Apr. 1967.

HASTIE, A.C. Hybridization of *Verticillium albo-atrum* and *Verticillium dahliae*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* v. 60, p.511-523, 1973.

HAUGLAND, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6.rd.edn. Eugene: Molecular Probes, 1996. 210p.

HE, C. *et al.* Transfer of a supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Genetics*, v.150, p. 459-466, 1998.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomerella cingulata* (Stonem.) Spauld. et v. Schrenck. 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.

LESLIE, J.F. Fungal vegetative compatibility. *Annual Review of Phytopathology*, Palo Alto, v.31, p.127-150, 1993.

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.

MAGALLANES, M.G.R. *et al.* Citologia de esporos de *Colletotrichum gossypii* e *C. gossypii* var. *cephalosporioides* em meio de cultura. *Fitopatologia Brasileira*, v.23, p.255. 1998. Suplemento.

MASEL, A.M. *et al.* Highly variable molecular karyotypes in the plant pathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Flavour and Fragrance Journal*, Chichester, v.18, p.81-86, 1990.

MENEZES, J.R.; DIANESE, J.C. Race characterization of Brazilian isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* and detection of resistance to anthracnose in *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, v.78, p. 650-655, 1988.

O'SULLIVAN, D. *et al.* Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetics*, v.33, p.291-298, 1998.

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

SAUPE, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 64, n.3, p.489-502, Sept. 2000.

SICARD, D. *et al.* Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centres of origin of its wild host *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, v.87, p.807-813, 1997.

SILVA-MANN, R. *et al.* Variabilidade genética de isolados do complexo *Colletotrichum* associados à sementes de algodociro, por meio de técnicas moleculares e inoculação em plantas. *Fitopatologia Brasileira*, 2002 (no prelo).

TU, J.C. An improved Mathur's medium for growth, sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbios*, v. 44, p.87-93, 1985.

UCHIDA, K.; ISHITANI, C.; IKEDA, Y.; SAKAGUCHI, K. An attempt to produce interspecific hybrids between *Aspergillus oryzae* and *A. sojae*. *Journal of General Microbiology*, v.4, p.31-38, 1958

WALTON, J.D. Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. *Fungal Genetics and Biology*, v.30, p.167-171, 2000.

CAPÍTULO 4

DINÂMICA E CARACTERÍSTICAS NUCLEARES DAS ANASTOMOSES ENTRE CONÍDIOS EM *Colletotrichum*

lindemuthianum

RESUMO

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Dinâmica e características nucleares das anastomoses entre conídios em *Colletotrichum lindemuthianum*. In: _____. **Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios.** 2002. Cap. 4, p. 92-138. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

Colletotrichum lindemuthianum (forma sexual *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*) é o agente causal da antracnose do feijociro (*Phaseolus vulgaris*). Um grande número de raças fisiológicas e um expressivo polimorfismo cromossômico têm sido descritos para esta espécie. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela origem dessa variabilidade não são bem conhecidos. A ocorrência da reprodução sexual tem sido demonstrada em condições de laboratório e indicada como possível fonte para essa variação. Porém, não há relatos da sua ocorrência em condições naturais. Um estudo citogenético foi realizado e observou-se a formação de anastomoses entre conídios, bem como uma nova seqüência de eventos relacionadas à atividade nuclear e à passagem de núcleos, evidenciando-se também fusões e divisões. Micromanipulações permitiram demonstrar que núcleos diferentes podem estar presentes no complexo formado pelas anastomoses entre conídios. Estes mecanismos podem consistir numa alternativa para gerar variabilidade nesta espécie.

* Comitê Orientador: Lisete Chamuna Davide - UFLA (Professora orientadora), Alan E. Wheals - Universidade de Bath-UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

ABSTRACT

ROCA MAGALLANES, Maria Gabriela. Nuclear characteristics and dynamics in anastomosis between conidia of *Colletotrichum lindemuthianum*. In: _____. **Recombinação genética em *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de anastomoses entre conídios**. 2002. Cap. 4, p. 92-138. Thesis (Doctoral in Genetics and Plant Breeding) – Universidade Federal de Lavras, Lavras*.

Colletotrichum lindemuthianum (sexual form *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*) is the pathogen responsible for anthracnose of the common bean (*Phaseolus vulgaris*). A large number of physiological races and substantial chromosomal polymorphism have been described in this species but the mechanisms for creating this diversity are not well known. Sexual reproduction has been demonstrated in the laboratory and is a possible source of diversity, but has not been found in nature. A cytogenetic study was performed and anastomoses were found between conidia and novel sequences of nuclei exchange were demonstrated, suggesting also fusions and divisions. Micromanipulations permitted demonstrated the different nuclei could be present at the anastomoses complexes between conidia. These events could provide a novel route for generating genetic exchange.

* Guidance Committee: Lisete Chamma Davide - UFLA (Major Professor), Alan E. Wheals - Universidade de Bath-UK; Rosane Freitas Schwan - UFLA.

4.1 INTRODUÇÃO

Colletotrichum lindemuthianum é o agente causal da antracnose, a principal doença fúngica na cultura do feijoeiro (Rava & Sartorato, 1994; Perfect *et al.*, 1999). A forma meiospórica desse fungo (sexual ou teleomórfica), *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*, não foi observada na natureza, embora tenha sido demonstrada a sua ocorrência em condições de laboratório (Sutton, 1992; Bryson, 1990; Mendes-Costa, 1996; Roca, 1997).

Utilizando mutantes auxotróficos de *C. lindemuthianum*, estudos genéticos com recombinação somática produziram evidências da formação de heterocários por meio da fusão de protoplastos, embora a cariogamia não tenha sido demonstrada (Bos, 1985). Em outros fungos, fusão de tubos germinativos entre conídios, anastomoses entre conídios e formação de tubos de conexão têm sido verificados (Manners & Bampton, 1957; Schreiber & Green, 1966; Snetselaar & Mims, 1992; Uecker, 1994).

Em alguns fungos, para os quais a reprodução sexual nunca foi descrita na natureza (como o *C. lindemuthianum*), a variabilidade genética poderia ser incrementada por mecanismos que não seguem uma segregação mendeliana, como herança citoplasmática e/ou polimorfismo cromossômico (Kistler & Miao, 1992). Polimorfismo cromossômico (Roca, 1997; O'Sullivan *et al.*, 1998; Arce-Montoya, Sanchez-Garza & Simpson, 1998) e rearranjo genômico (O'Sullivan *et al.*, 1998) têm sido verificados em *C. lindemuthianum*. Em espécies relacionadas, polimorfismo cromossômico e elementos transponíveis também têm sido identificados (Masel *et al.*, 1990; Liyanage, McMillan & Kistler, 1992; He *et al.*, 1996; Zhu & Oudemans, 2000). Porém as melhores evidências genéticas de eventos durante a fase somática foram obtidos para *C. gloeosporioides*, tendo He *et al.* (1998) efetivamente mostrado transferência

cromossômica entre isolados vegetativamente incompatíveis. Porém, a demonstração de como esse mecanismo ocorre ainda continua desconhecida.

Em várias espécies de *Colletotrichum*, ainda não se sabe como eventos citológicos poderiam explicar a expressiva variabilidade genética encontrada (Sicard *et al.*, 1997; Gonzáles *et al.*, 1998; O'Sullivan *et al.*, 1998). Provavelmente, existem mecanismos que permitem uma recombinação somática de forma parassexual, como alternativa à ausência ou rara ocorrência do ciclo sexual. Eventos citológicos aqui descritos sugerem a existência de um novo mecanismo para a transferência de material genético entre isolados. Este mecanismo pode ser responsável pelo incremento, em parte, da variabilidade genética observada em *C. lindemuthianum*. O objetivo deste trabalho foi caracterizar a dinâmica das anastomoses entre conídios e verificar se este processo está relacionado a algum mecanismo que possa aumentar a variabilidade genética nesta espécie.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Isolados de *C. lindemuthianum* e meios de cultura

Isolados de *C. lindemuthianum* obtidos inicialmente de lesões de vagens de plantas de feijoeiro foram mantidos em meio de cultura batata-destrose-ágar (BDA) (Tabela 1).

As culturas monospóricas foram obtidas por meio de suspensões de conídios espalhadas nas placas com meio de cultura. As placas foram monitoradas com microscópio estereoscópico e os conídios germinados foram recolhidos com uma agulha e transferidos para uma nova placa com meio de cultura. As culturas monospóricas foram mantidas para crescimento e

esporulação em meio de Mathur's (M3S), com algumas modificações (Tu, 1985) a 20°C.

Além dos dois isolados selvagens de *C. lindemuthianum* foi utilizado o isolado H2, o qual é geneticamente modificado (Tabela 1). Este isolado possui na sua construção de transformação, o gene de resistência à higromicina (Punt *et al.*, 1987; Dumas *et al.*, 1999). Outras duas espécies também foram utilizadas: *C. gloeoporioides* isolado de café e *C. gossypii* isolado do algodoeiro (Tabela 1). Estes isolados foram mantidos também em BDA e M3S.

4.2.2 Definição das raças fisiológicas

Para confirmar a identidade das raças de *C. lindemuthianum*, os três isolados foram inoculados em cultivares diferenciadoras de feijoeiro, conforme metodologia descrita no capítulo 1 (Rava *et al.*, 1993).

4.2.3 Dinâmica do núcleo

Conídios foram coletados de corpos de frutificação ou esporodóquios em placas com M3S, em diferentes épocas para se avaliar o número de núcleos 'in vivo'. Para coloração dos núcleos utilizou-se o fluorocromo vital DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindole) da Molecular Probes, numa concentração de trabalho de 300 nM e suspensões celulares de 10^6 conídios/ml em tampão fosfato (Haugland, 1996). Duas metodologias foram utilizadas em função da idade do material.

TABELA 1 Isolados de *Colletotrichum* utilizados, com suas respectivas identificações e características.

Espécie	Isolado	Hospedeiro	Local de origem
<i>C. lindemuthianum</i>	401	Feijoeiro (raça 81)	Viçosa, MG
<i>C. lindemuthianum</i>	1020	Feijoeiro (raça 2047)	América Central
<i>C. lindemuthianum</i>	H2	Feijoeiro (raça 0)	Dumas <i>et al.</i> (1999)
<i>C. gossypii</i>	-	Algodoeiro	Campinas, SP
<i>C. gloeosporioides</i>	-	Cafeciro	Lavras, MG

Em amostras com dez dias ou menos realizou-se inicialmente uma suspensão de 10^6 conídios/ml em tampão fosfato, a qual foi lavada duas vezes para remover a mucilagem. Cem microlitros da suspensão foram então gotejadas numa lâmina de microscopia, a qual foi seca ao ar. Para assegurar a penetração por difusão, as células foram permeabilizadas, utilizando-se triton 2%, por 20 minutos. As lâminas foram, então, lavadas em tampão fosfato e 50 μ l do DAPI, na concentração de trabalho, foram espalhados sobre o esfregaço de células e deixados por 15 minutos no escuro. O excesso foi removido e as lâminas montadas em tampão fosfato para observação no microscópio.

A metodologia utilizada para suspensões celulares de culturas com mais de quinze dias foi a seguinte: suspensões celulares foram centrifugadas e ressuspensas em tampão fosfato. O DAPI estoque foi adicionado diretamente nas suspensões para conseguir a concentração de trabalho (300nM). As lâminas foram preparadas diretamente desta suspensão, vedadas e deixadas no escuro por trinta minutos, para posteriormente serem visualizadas.

Para visualização dos núcleos corados com DAPI, utilizou-se um microscópio de epifluorescência Olympus BX60 (MF), com filtro de excitação ultravioleta (UG-1), espelho dicromático de 400nm e filtro de barreira de mais

de 435nm. As imagens foram adquiridas com câmera digital Nikon CoolPix 950 (1.600 x 1.200 pixels no máximo de resolução).

Para a obtenção das amostras foram preparadas nove placas para os isolados 401 e 1020, os quais foram colocados para crescer em um fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas escuro. Foram também preparadas seis placas para cada um dos dois isolados, as quais foram mantidas o tempo todo no escuro e outras seis, o tempo todo na luz. Coletas das amostras foram realizadas em diferentes intervalos de tempo após o início da esporulação (10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias). Para cada época, as avaliações foram realizadas em amostra contendo, pelo menos, 1000 conídios. Foram registrados o número de núcleos por conídio não envolvidos em anastomoses, o número de conídios em anastomoses entre 2, 3 e 4 conídios, número de núcleos por complexo de anastomose, número de conídios com tubos em início da anastomose e seu número de núcleos. Para cada uma destas avaliações foram confeccionadas três lâminas e, de cada lâmina, foram avaliadas três amostras.

4.2.4 Tamanho e distribuição dos núcleos

Foram utilizadas células previamente fixadas para a visualização dos núcleos e dos microtúbulos. Para isto, as células foram inicialmente lavadas em tampão fosfato e fixadas em carnoy acético 4°C (3 metanol: 1 ácido acético). O carnoy a 4°C foi trocado três vezes, em intervalos de 15 minutos. Após a última suspensão, as células foram armazenadas em minitubos a -20°C.

Na seqüência, 100µl da suspensão de células (10⁶ conídios/ml) foram colocados na lâmina e esta deixada para secar a 50°C por 30 minutos aproximadamente. Em seguida as células foram permeabilizadas com 50µl de GlucanexTM (enzima lítica da NovoDiskTM) 75mg/ml em tampão SCE pH3-4 a 37°C, por 3 horas. O excesso foi lavado em tampão fosfato e, mais uma vez, fez-se a permeabilização com triton 2%, no mesmo tampão, por 10 minutos. A

permeabilização com enzima não foi realizada em amostras com mais de 15 dias.

Para observação dos microtúbulos, 50µl de FITC-conjugado a faloidin (Sigma, 0,01µg/µl em tampão fosfato) foram gotejados sobre uma lâmina e deixados no escuro por 5 minutos. O exsso foi lavado com tampão fosfato. Para visualização do núcleo, utilizaram-se 50µl de iodeto de propídio (Sigma, 0,02 µg/µl em tampão fosfato), no escuro, por 5 minutos. O excesso foi lavado com tampão fosfato. Finalmente, as lâminas foram montadas em 20µl de mowiol ('antialvejante', 6g glicerol, 2,4g mowiol-4-88 CalbiochemTM, 6ml água bidestilada, 1ml tris-HCl 0,2M pH8,5).

Para a análise de rotina foi utilizado um microscópio LSM 510 da Zeiss (LSCM) com um laser de Argon (458, 488nm) e um laser HeNeI (543nm). Imagens simultâneas de campo claro, fluorescência ou confocal foram adquiridas quando necessário. Empregou-se uma objetiva de imersão a óleo 63x Oil DIC Plan-Apochromat (NA 1.4).

O microscópio foi calibrado da mesma forma para a obtenção dos cortes óticos. Foram medidos núcleos dentro de uma mesma lâmina em preparações citológicas do mesmo dia, para comparação dos tamanhos. A medida dos núcleos baseou-se somente na área. Eles foram analisados em um computador Macintosh com programa NIH image 1,62 disponível gratuitamente para uso público (desenvolvido pelo U.S. National Institutes of Health e disponível na internet no endereço <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>).

4.2.5 Digestão enzimática das paredes

Para verificar a solidez das anastomoses, suspensões de conídios com anastomoses e sem anastomoses, foram submetidas à digestão da parede celular com o auxílio de enzimas até a formação dos esferoplastos. Para isto, foi utilizada a mistura de 20mg/ml de glucanase (InterspexTM) e 20mg/ml de

driselase (Interspex™) em tampão ST1 (1M sorbitol, 20mM citrato de sódio, pH5,8). Esta solução foi centrifugada para remover as partículas não diluídas e esterilizada por meio de filtro de furos com 0,22µm de diâmetro. O processo foi monitorado no microscópio ótico, à temperatura de 27°C até a formação dos esferoplastos, selecionando-se campos no microscópio que permaneceram sem movimento na lâmina concavada. Foram preparadas cinco repetições.

4.2.6 Microculturas

Lâminas para microcultivos de células foram inoculadas com um fino filme de água e conídios em alta densidade, para verificar ao microscópio o encontro entre eles. Foram utilizadas concentrações entre 2000 e 3000 conídios/ml e monitoradas no microscópio de contraste de fase e confocal.

4.2.7 Encontros entre diferentes isolados

Para checar a possibilidade de compatibilidade vegetativa os isolados 401, 1020 e H2 foram transferidos, dois a dois, nas extremidades das placas com M3S e avaliada a área de encontro entre ambos, após o crescimento.

Outra forma utilizada para propiciar encontro entre isolados (dois a dois) foi por meio da mistura de suspensões de conídios, nas mesmas concentrações, em um mesmo minitubo (Bryson, 1990). As suspensões de conídios foram então inoculadas em água por 24 horas, após lavagem da mucilagem. Estas suspensões foram posteriormente inoculadas nas placas contendo M3S.

Também foram realizadas microculturas em lâminas para microscopia apropriadas para o microcultivo com dois isolados diferentes, um de *C. gossypii* e o outro de *C. lindemuthianum* (H2) (selecionados por terem esporos de fácil reconhecimento). As cavidades foram preenchidas com M3S sólido e, após a inoculação dos conídios, elas foram cobertas com laminula de vidro e vedadas

com esmalte para evitar dessecação do meio. Cada suspensão de conídios foi obtida após sucessivas diluições até alcançar a concentração de aproximadamente 1000 conídios/5µl.

4.2.8 Ensaio com a mucilagem

Foram utilizados os isolados 401 e 1020, com sete dias, para obtenção dos esporos e com 15 a 20 dias, para obtenção da mucilagem.

A mucilagem foi obtida fazendo-se uma suspensão de 3×10^6 conídios em 100µl de água, a qual foi centrifugada e a suspensão intermediária de cor marrom (aproximadamente 20µl, entre os conídios e a água) foi coletada. Esta suspensão foi colocada cuidadosamente sobre placas de petri de 5cm de diâmetro contendo ágar-água 2%. Sobre a mucilagem foram colocados 20 µl de suspensão de conídios com sete dias, numa concentração de 500 conídios/ml. A suspensão de conídios tinha sido previamente inoculada em água por 24 horas. Cobriu-se uma área da placa com lamínula de vidro para microscopia e esperou-se o crescimento da cultura. A placa foi aberta para observação diretamente no microscópio em períodos de tempos diferentes (cada doze horas durante seis dias).

4.2.9 Análises genéticas

Suspensões de conídios preparadas com os isolados 401, 1020 e H2, misturados duas a duas foram inoculadas em placas. As concentrações, inoculações e procedimentos foram explicadas no item 5.2.7 (segundo parágrafo). Foram então preparadas amostras de suspensões celulares, partindo de corpos de frutificação ou esporodóquios com 15 dias.

Das amostras de suspensões celulares foram coletados conídios em anastomose, com o auxílio de um micromanipulador hidráulico acoplado ao microscópio de luz. Estes conídios em anastomose foram inoculados

isoladamente (mantendo o complexo de anastomoses) para formar novas culturas em meio M3S líquido (TU, 1985) e deixadas para crescer. As culturas foram mantidas no escuro, em temperatura ambiente, até formar um fino filme de micélio (três dias, aproximadamente). Desta cultura, foram coletadas as quantidades de micélio necessárias para se obter o molde de DNA para PCR.

O molde foi obtido após suspensão de pontas de micélio em 5µl de água millipore e incubação durante um minuto, como descrito no Capítulo 3.

Foram utilizados diferentes iniciadores (primers) de DNA (Tabela 2), desenhados com base em seqüências de DNA previamente conhecidas e disponíveis na literatura. A mistura e condições de reação foram realizadas como descritas no capítulo 3.

TABELA 2 Seqüência de bases nitrogenadas (DNA) dos primers desenhados e utilizados em PCR com as respectivas referências.

Primers	5' - 3'	Referências
<i>hphr1</i>	GCA GCC GGT CGC GGA GGC CAT GG	Punt <i>et al.</i> , 1987
<i>hphr6</i>	CGC CCG GAG CCG CGG CGA TCC TGC	Punt <i>et al.</i> , 1987
<i>clpg1</i>	CAA GGG CAC CAC CAC CTT TGG CTA C	Centis <i>et al.</i> , 1997
<i>clpg2</i>	GCT CGA CGT TGA CAC TGG GAC GGT	Centis <i>et al.</i> , 1997

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Características do complexo de anastomoses entre conídios

O ensaio enzimático mostrou resistência das anastomoses entre conídios, mesmo após a desintegração da parede. O acompanhamento foi efetuado em cinco campos e foram consideradas somente anastomoses entre dois conídios e com tubos de, no máximo, 4 μm de comprimento, o que facilitou a visualização ao microscópio.

Com a intenção de se conhecer a seqüência em que eram formadas as cadeias de anastomoses, foram quantificadas as anastomoses com dois, três e quatro conídios. Os resultados apresentados nas Tabelas 3, 4 e 5 indicam que o processo inicia-se entre dois conídios e, ao passar do tempo cadeias são formadas. Não foram realizadas avaliações com mais de quatro conídios, porque o problema de profundidade de campo não podia ser contornado.

O padrão de eventos: início com dois conídios e posterior formação de cadeias, parece ser igual, mesmo em condições de fotoperíodos diferentes (Tabela 4 e 5). No entanto, nota-se que, em fotoperíodos diferentes aos de 12 horas luz/12 horas escuro, as freqüências de anastomoses parecem diminuir. Também foram observadas freqüências diferentes entre os dois isolados.

Quando o complexo de anastomoses foi formado entre menos de quatro conídios, dois tubos de anastomose por conídio foram encontrados. À medida que o número de conídios aumenta, também podem ser encontrados três tubos/conídios fazendo parte do complexo.

Anastomoses entre conídios também foram encontradas em *C. gossypii* (isolado de algodociro) e *C. gloeosporioides* (isolado de cafeeiro), em condições similares às de *C. lindemuthianum*: placas de petri com mais de quinze dias de esporulação, meio M3S, 20°C e fotoperíodo de 12 horas luz/12 horas no escuro. No entanto, não foram quantificadas (Figura 1).

TABELA 3 Porcentagem do número de conídios envolvidos em anastomoses (entre dois, três e quatro conídios) em dois isolados de *C. lindemuthianum*. Amostras de 1000 células. 12 horas sob luz/12 horas no escuro.

Isolados	401					1020					
	Días	10	15	25	30	40	10	15	25	30	40
2 conídios	-	-	2,2	7,4	6,0	-	-	0,6	2,0	9,2	
3 conídios	-	-	1,2	4,8	5,4	-	-	-	0,6	4,2	
4 conídios	-	-	-	0,8	4,8	-	-	-	>0,1	5,6	
Livres	100	100	96,6	87,0	83,8	100	100	99,4	97,3	81	

TABELA 4 Porcentagem do número de conídios envolvidos em anastomoses em dois isolados de *C. lindemuthianum*. Amostras de 1000 células. 12 horas no escuro.

Isolados	401				1020				
	Días	10	15	25	30	10	15	25	30
2 conídios	-	-	3,5	2,0	-	-	0,2	6,1	
3 conídios	-	-	0,5	1,0	-	-	-	-	
4 conídios	-	-	0,6	1,3	-	-	-	-	
Livres	100	100	95,4	95,7	100	100	99,8	93,9	

TABELA 5 Porcentagem do número de conídios envolvidos em anastomoses em dois isolados de *C. lindemuthianum*. Amostras de 1000 células. 12 horas sob luz.

Isolados	401				1020				
	Días	10	15	25	30	10	15	25	30
2 conídios	-	-	-	3,6	-	-	0,3	0,6	
3 conídios	-	-	0,4	1,0	-	-	-	-	
4 conídios	-	-	-	-	-	-	-	-	
Livres	100	100	99,6	95,4	100	100	99,7	99,4	

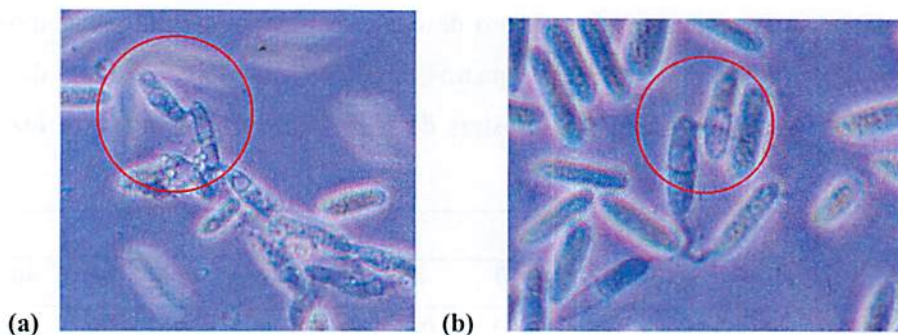


FIGURA 1 (a) Anastomoses entre conídios em *C. gossypii* e (b) *C. gloesporioides*. Barra: 5 μm .

4.3.2 Cinética da formação das anastomoses

Na microcultura, verificou-se que, após cinco dias da germinação de um conídio, formam-se o micélio e os miolos de hifas. Alguns dos miolos de hifas formam primórdios de acérvulos ou corpos de frutificação ou esporodóquios. Estes novos podem ser originados de um ou mais conídios (Figura 2). Entre sete a dez dias, nenhum conídio em anastomose foi encontrado (Figura 3a). Neste período observam-se, porém, conidióforos gerando conídios na ponta (tipo blástico). Os conídios se mantiveram próximos nos corpos de frutificação, unidos pela mucilagem (Figura 3b).

No ensaio com mucilagem, a esporulação iniciou-se três dias após a inoculação. Não sendo formadas hifas longas, foi possível verificar que os conidióforos originavam-se de uma célula (Figura 4) ou duas células, as quais formavam novos em que os conidióforos se encontravam (Figura 5). Após sete dias, não houve mais crescimento e nem desenvolvimento. É importante lembrar que este ensaio foi realizado em ágar-água sem nutrientes, para dar condições extremas à cultura.

Nas microculturas com misturas de conídios de diferentes isolados foi observada a produção de acérvulos, corpos de frutificação ou esporodóquios,

similar à descrita anteriormente. Consideramos como única diferença entre esporodóquios e acérvulo, que este último deve apresentar a epidermis da planta. Também observou-se que os esporóquios estavam tão próximos que os conídios produzidos em um podiam entrar em contato com os conídios produzidos por outro (Figura 6). Para verificar que não houve falta de crescimento (nos encontros propiciados após inoculação nas extremidades das placas), por falta de nutrientes, foi adicionado novo meio na área de encontro entre isolados ou esta área foi transferida para uma placa com meio novo e a reação de incompatibilidade vegetativa entre os isolados se manteve (Figura 7).

Dois tipos distintos de anastomoses foram identificados. Aquelas encontradas no centro dos esporodóquios esmagados, normalmente com tubos mais curtos ($<5\mu\text{m}$) e aquelas que se encontravam ao redor dos corpos de frutificação, formando longas cadeias (Figura 8), às vezes com tubos longos de até $20\mu\text{m}$.



FIGURA 2 Novelo de hifas formado de mais de um conídio (alguns dos conídios estão em anastomose). Seqüência de fotos realizadas a cada três horas.

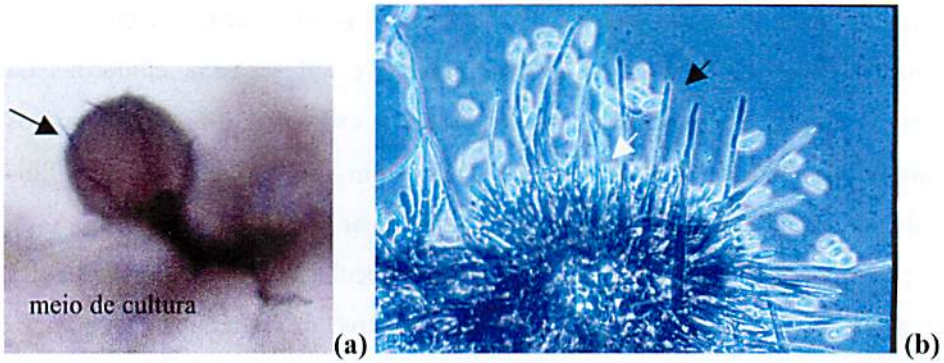


FIGURA 3 (a) Corpo de frutificação ou esporodóquio, barra: 40 μm ; (b) processo de conidiogênese, seta branca mostra conídioforos. barra: 10 μm . Setas pretas mostram seta do fungo



FIGURA 4 Formação e esporulação no ensaio de mucilagem. Diferentes estágios da conidiogênese iniciados de uma única célula. Barra: 5 μm .

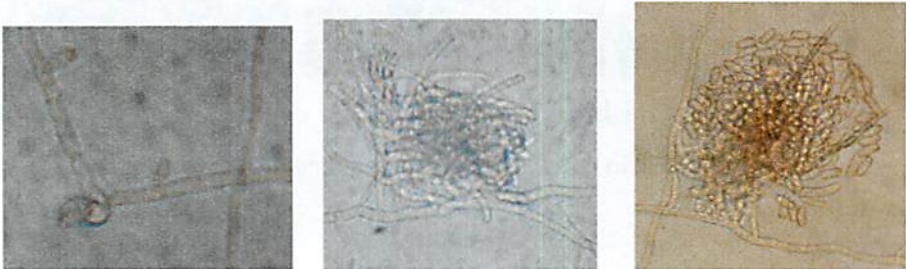


FIGURA 5 Formação e esporulação no ensaio de mucilagem. Diferentes estágios da conidiogênese, originados de mais de uma célula. Barra: 15 μm .

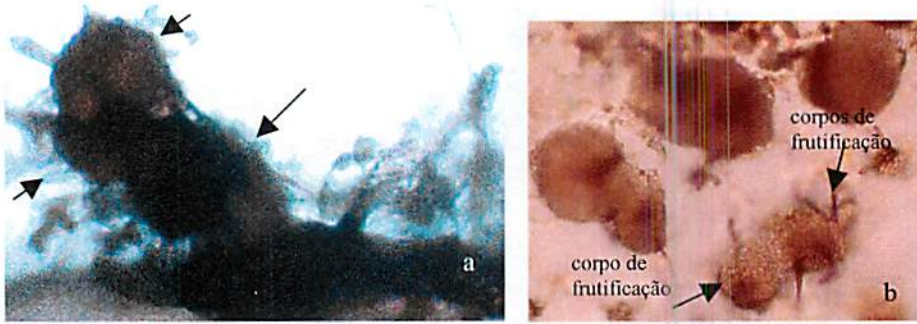


FIGURA 6 Esporodóquios próximos nas microculturas com mistura de isolados de *C. gossypii* e de *C. lindemuthianum* (H2). (a) Três esporodóquios. Barra: 30 μ m; (b) vários acérvulos. Barra: 30 μ m.

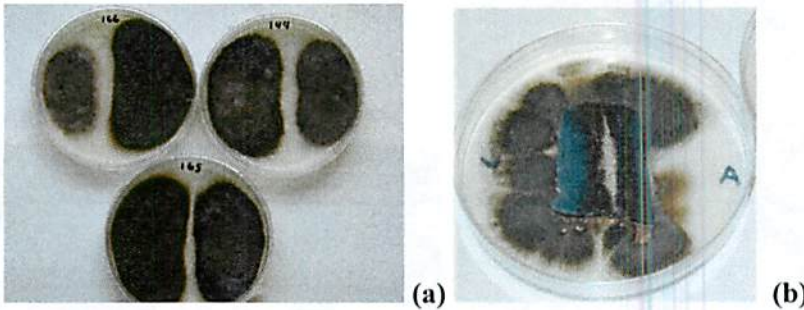


FIGURA 7 Incompatibilidade vegetativa entre isolados de *C. lindemuthianum*. (a) Após 25 dias. (b) Após 30 dias com suplementação de meio de cultura. Placas de 9cm de diâmetro.

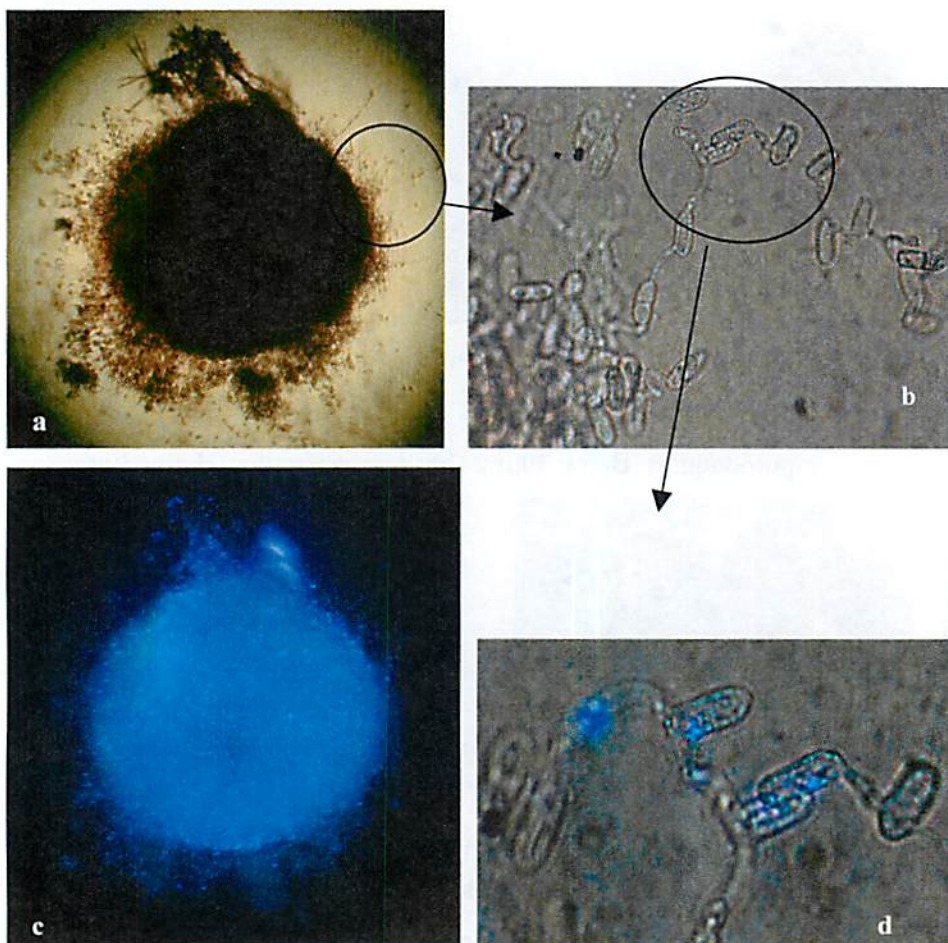


FIGURA 8 (a) Corpo de frutificação e (b) detalhe ao redor com conídios em cadeias de anastomoses; (c) mesmo corpo após coloração com DAPI; (d) detalhe de núcleos (pela profundidade de campo não aparecem alguns núcleos). Barra: 10 μ m.

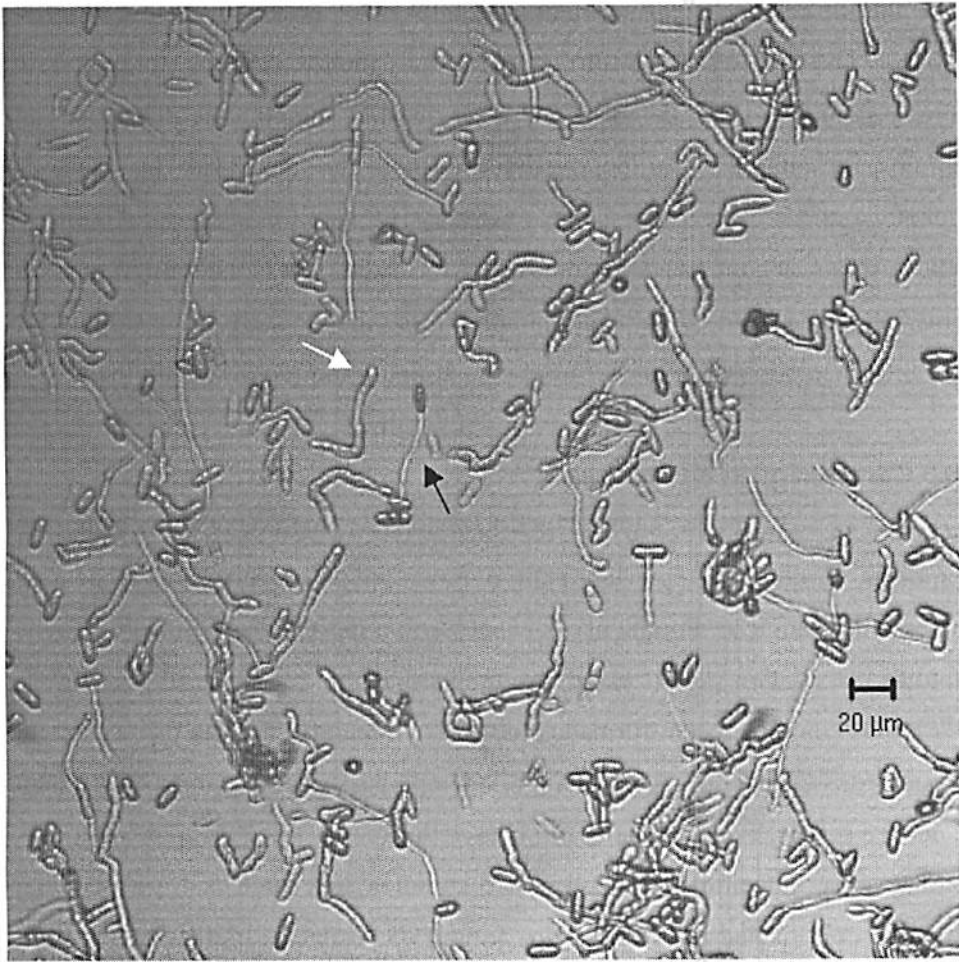


FIGURA 9 Início de formação de tubos germinativos (seta branca) e tubos de anastomoses (seta preta) em lâminas de microcultivo com água. Isolado 1020.

Foi impossível acompanhar o processo de formação das anastomoses *in vivo*, porque o emaranhado formado nos corpos de frutificação impedia a obtenção de imagens. Na lâmina de microcultivo com água foi possível ver o

início do processo, verificar as diferenças entre tubos germinativos ($>3,8 \mu\text{m}$) e tubos de anastomoses ($<3,8 \mu\text{m}$), porém como muitos confídios apresentaram tubos germinativos ou de anastomose ao mesmo tempo e a densidade de confídios foi alta, não foi possível ver o momento da fusão. Os isolados diferenciaram-se neste processo. No isolado H2 não foi observado o início embora foram encontradas anastomoses já formadas. No isolado 1020, após 6 horas, já havia emissão do tubo germinativo e do tubo de anastomose (Figura 9), enquanto o isolado 401 levou 12 horas para atingir o mesmo desenvolvimento.

4.3.3 Características dos núcleos

A observação dos núcleos foi dificultada nos confídios frescos (menos de dez dias), o que foi resolvido com o emprego de impermeabilizações no processo de coloração. Porém, não foi necessário o mesmo procedimento para os confídios mais velhos porque as células rompiam-se.

Os confídios recém-formados (dez dias ou menos), em sua maioria, eram uninucleados (Tabela 6). À medida que o tempo passava, surgiam confídios sem núcleos e binucleados (Tabela 6). Esta redução na frequência de confídios uninucleados, aumento de binucleados e confídios sem núcleos foi observada, para os dois isolados, através do tempo. O isolado 1020 alterou mais rapidamente os valores inicialmente apresentados nos confídios frescos, nas diferentes condições utilizadas (Tabelas 6, 7 e 8).

Foram também observados núcleos em divisão, evidenciando cromossomos (Figura 10a), fragmentação nuclear e micronúcleos (Figura 10b), sempre em confídios uninucleados.

Confídios em início de formação do tubo de anastomose foram observados em baixa frequência, como apresentado na Tabela 9.

A partir dos dados de área dos núcleos tentou-se, de forma comparativa, sugerir os prováveis níveis de ploidia ou conteúdos de DNA. O mesmo

procedimento foi utilizado, no mesmo material e na mesma calibração do microscópio (Tabela 10, Figura 11). Foi realizado um agrupamento (oito classes) com a função 'one-way frequency' do program MSTATC 1.41, numa amostra de 44 células (dez lâminas), e sugerido um reagrupamento para quatro classes, correspondendo às seguintes etapas do ciclo celular: nG1 (haplóide na fase G1 da intérfase); 2nG1 (diplóide na fase G1 da intérfase); nG2 (haplóide na fase G2 da intérfase) e 2nG2 (diplóide na fase G2 da intérfase).

Alguns exemplos permitem comparar o tamanho dos núcleos em células em que os núcleos seriam 'irmãos' (originados por mitose) (Figura 11), assim como daqueles conídios em anastomoses (Figura 12).

TABELA 6 Percentagem de conídios com diferentes números de núcleos em uma amostra total de 500 conídios. Isolados 401 e 1020 em condições de 12 horas luz/12 horas escuro. Média de três repetições.

Isolados	401				1020			
	10	15	25	30	10	15	25	30
Conídio - 1 núcleo	99,3	94,7	93,9	86,5	98,8	72,3	71,0	50,5
Conídio - 0 núcleo	0,7	5,3	2,8	11,97	0,1	5,1	23,0	48,1
Conídio - 2 núcleos	-	-	3,3	1,53	1,1	22,6	6,0	1,4

TABELA 7 Percentagem de conídios com diferentes números de núcleos em uma amostra total de 500 conídios. Isolados 401 e 1020 em condições de 12 horas no escuro. Média de três repetições.

Isolados	401				1020			
	10	15	25	30	10	15	25	30
Conídio - 1 núcleo	99,8	94,2	81,8	93,7	99,6	94,9	82,8	83,6
Conídio - 0 núcleo	0,20	2,1	18,0	4,5	0,4	0,9	1,1	7,9
Conídio - 2 núcleos	-	3,7	0,16	1,9	-	4,2	16,1	8,6

TABELA 8 Percentagem de conídios com diferentes números de núcleos em uma amostra total de 500 conídios. Isolados 401 e 1020 em condições de 12 horas luz. Média de três repetições.

Isolados	401				1020			
	10	15	25	30	10	15	25	30
Conídio – 1 núcleo	99,7	97,9	94,8	97,2	100	97,0	85,0	81,5
Conídio – 0 núcleo	0,3	0,2	5,0	1,7	-	1,0	9,5	14,1
Conídio – 2 núcleos	-	2,0	0,3	1,1	-	2,0	5,3	4,5
Conídio – 3 núcleos	-	-	-	-	-	-	0,2	-

TABELA 9 Número de núcleos e porcentagem de conídios com tubo de anastomose, em início de formação, de dois isolados de *C. lindemuthianum*.

Isolados	401			1020			
	Tempo (dias)	25	30	40	25	30	40
Com 1 núcleo	-	-	1,0	2,9	0,1	1,8	2,0
Com 2 núcleos	-	-	-	0,6	0,7	0,6	2,4
Total	-	-	1,0	3,5	0,7	2,4	4,4

TABELA 10 Distribuição da frequência absoluta da área (μm^2) de núcleos de conídios uninucleados do isolado 401 com 20 dias de inoculação. As imagens foram obtidas de seções óticas no microscópio confocal.

Início (μm^2)	Fim (μm^2)	Frequência	Média(μm^2)	Descrição sugerida
0,15	1,68	5	1,01	Micronúcleos
1,69	3,21	15	2,41	nG1 = 1C
3,22	4,75	14	3,97	2nG1 nG2 = 2C
4,76	6,28	9	5,62	2nG2 = 4C

Média=3,48 μm^2 , desvio padrão= 0,02. Conteúdo de DNA= 1C: 1 genoma; 2C: 2 genomas; 4C: 4 genomas.

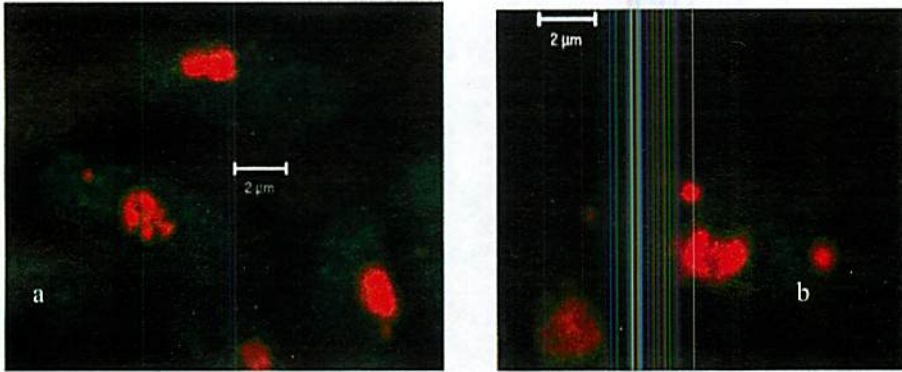


FIGURA 10 (a) Cromossomos; (b) fragmentação do núcleo e micronúcleos em conídio uninucleado. Isolado 401, 20 dias.

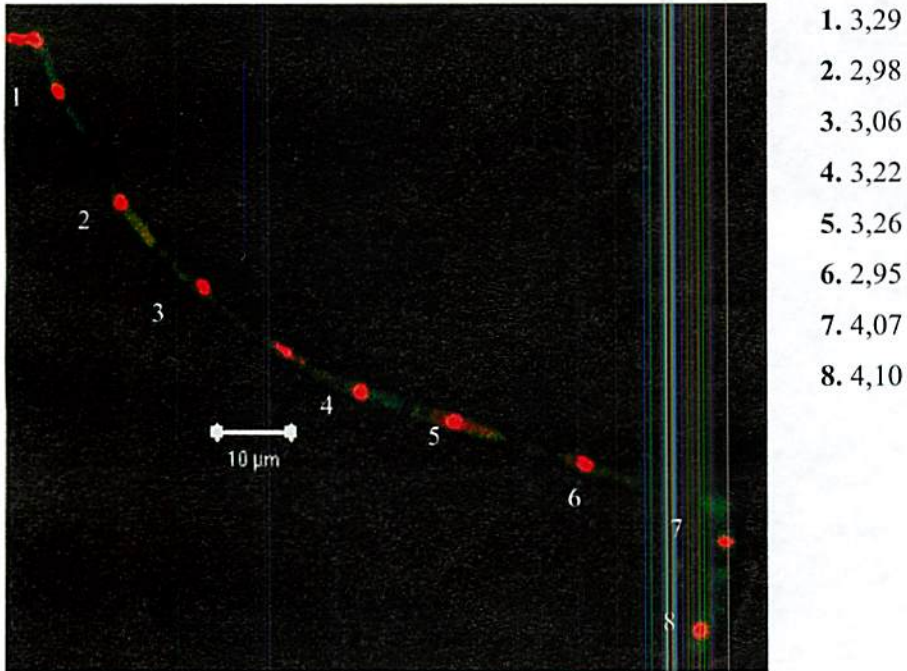


FIGURA 11 Seção ótica de uma hifa corada com iodeto de propídio para os núcleos (vermelho) e faloiden para os microtúbulos (verde). Valores das áreas dos núcleos, dados em μm^2 , indicadas pelos diferentes números em branco. Isolado 401.

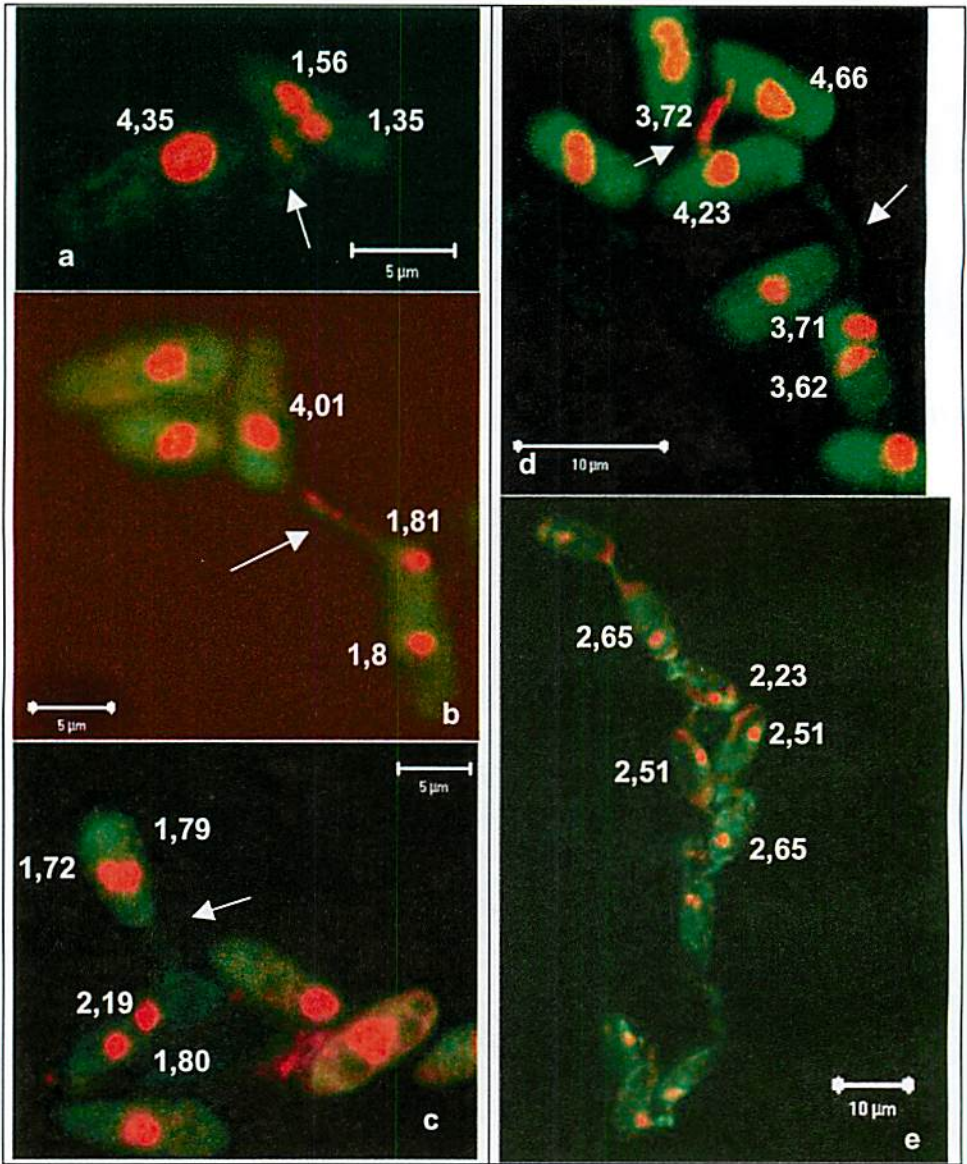


FIGURA 12 Sobreposição de seções óticas. Área dos núcleos em branco e em μm^2 . Isolado 401, vinte dias. **(a-c)** Anastomoses (seta) entre dois conídios; fragmento na anastomose, **(d)** anastomoses entre três conídios; **(e)** cadeias de conídios em anastomoses.

Não foi possível conseguir repetições suficientes para medição dos núcleos nos conídios em anastomoses, como efetuado para os conídios individuais (dados vindos da mesma lâmina). Dessa forma, foi difícil estabelecer uma metodologia experimental ou construir uma distribuição de frequência para os núcleos dos conídios em anastomoses, baseado na mesma metodologia utilizada para os conídios individuais. No entanto, as seções consecutivas dos cortes óticos realizados no confocal confirmam que as diferenças observadas em tamanhos de núcleos e fragmentos não foram devidas à sobreposição de imagens. Pode-se ainda observar que, nas diferentes seções óticas, diferenças no tamanho dos núcleos existem (Figura 13), independente da sobreposição apresentada na Figura 12. Estas observações repetiram-se com o uso de DAPI, sem o uso de fixadores (não foram realizadas medições).

4.3.4 Posição e número de núcleos nos conídios em anastomoses

A coloração *in vivo*, principalmente, confirmou que o número de núcleos nem sempre correspondia ao mesmo número de conídios envolvidos nas anastomoses (Tabela 11). Foram encontradas, por exemplo, anastomoses entre dois conídios, com um, dois e três núcleos (Figura 14). Mesmo considerando o grande número de imagens adquiridas com os diferentes fluorocromos utilizados (Figura 15), foi difícil sugerir uma seqüência de eventos. Isto foi dificultado também pela ocorrência de mais de dois tubos por conídios em anastomoses, quando complexos de longas cadeias entre conídios foram encontrados (Figura 16).

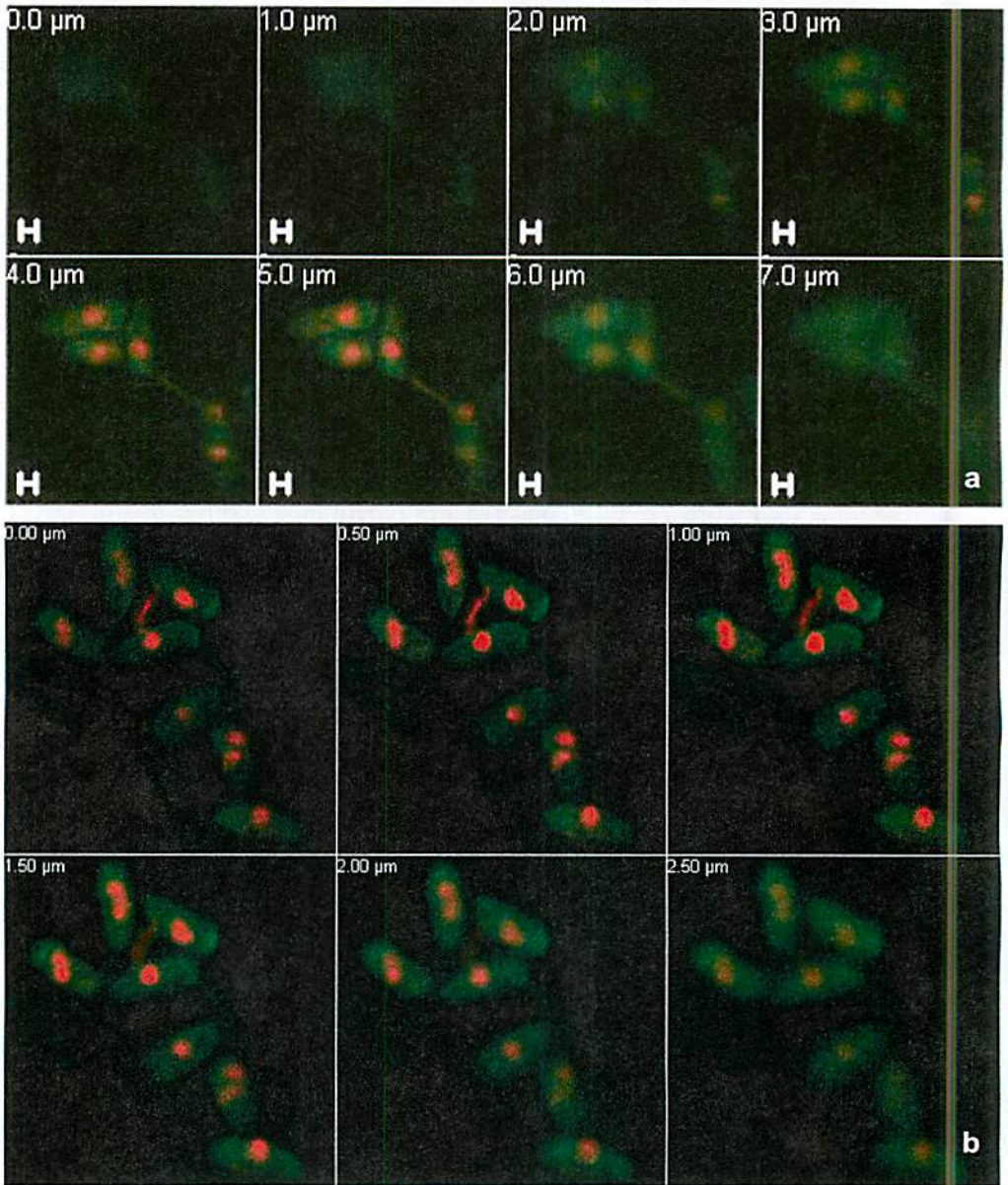


FIGURA 13 Seções óticas consecutivas obtidas no confocal. Isolado 401. (a) Seções óticas da imagem 12b (1 μ m de espesura) corte; (b) seções óticas da imagem 12d, (0,5 μ m de espesura). Barra: 5 μ m.

TABELA 11 Porcentagem de anastomoses com diferentes números de conídios e diferentes números de núcleos. Isolados 401 e 1020. Média de três repetições. Fotoperíodo 12 horas luz/12 horas no escuro.

Isolados	401			1020		
	Dias	25	30	40	25	30
2 conídios/0 núcleo	-	-	13,3	-	40,0	21,7
2 conídios/1 núcleo	27,2	16,2	20,0	66,7	10,0	30,4
2 conídios/2 núcleos	72,7	83,8	66,7	-	30,0	43,5
2 conídios/3 núcleos	-	-	-	33,3	20,0	4,4
3 conídios/0 núcleo	-	-	22,2	-	-	71,4
3 conídios/2 núcleos	-	37,5	-	-	-	14,3
3 conídios/3 núcleos	100	56,3	61,1	-	3,0	14,3
3 conídios/4 núcleos	-	6,3	16,7	-	-	-
3 conídios/5 núcleos	-	-	-	-	97,0	-
4 conídios/ 0 núcleo	-	-	25,0	-	-	50,0
4 conídios/ 3 núcleos	-	-	16,7	-	100	-
4 conídios/ 4 núcleos	-	-	58,3	-	-	50,0

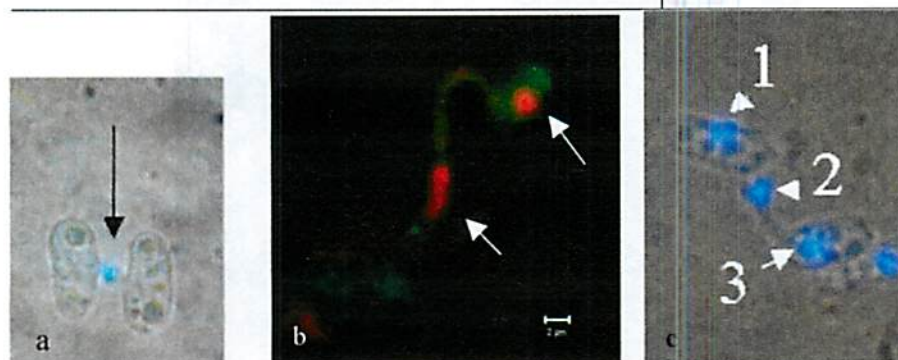


FIGURA 14 Anastomoses entre dois conídios com (a) 1 núcleo, barra: ; (b) 2 núcleos e (c) 3 núcleos, barra: 3 μm .

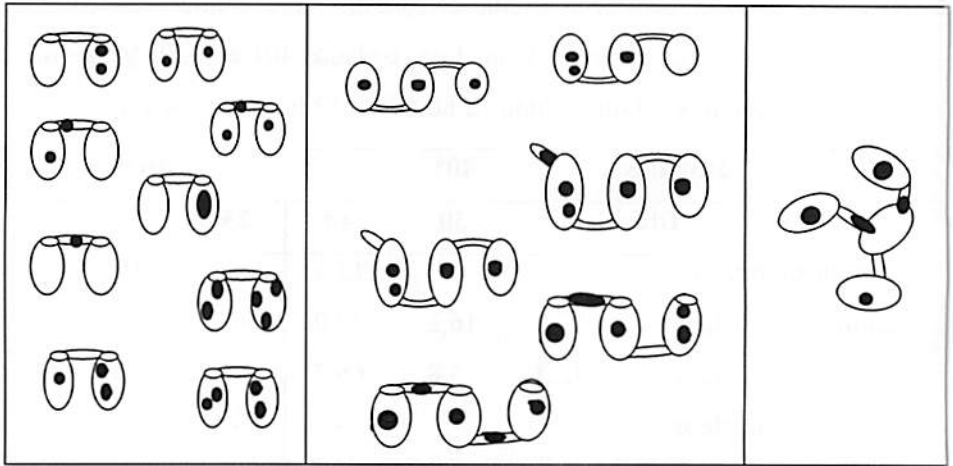


FIGURA 15 Representação esquemática do número e posição dos núcleos encontrados nas anastomoses entre conídios.

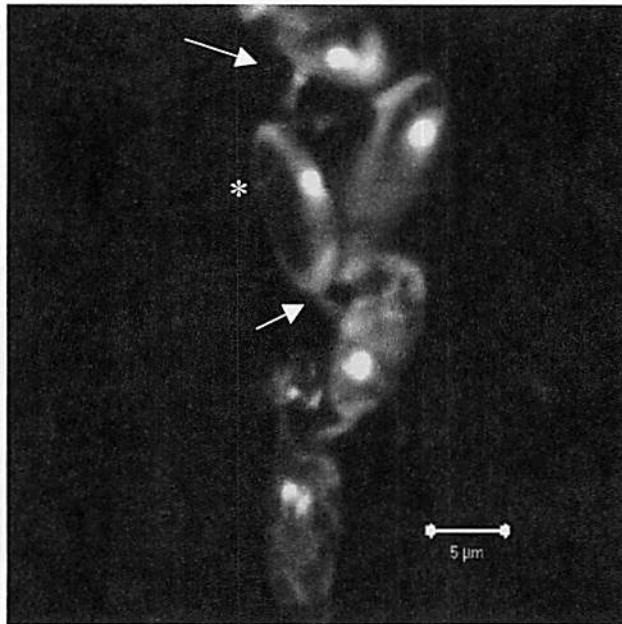


FIGURA 16 Detalhe da Figura 12e. Complexo de anastomoses formado por cadeias de conídios unidos por dois e três tubos de anastomoses. Setas indicam a posição dos tubos (3) num único conídio (*).

4.3.5 Genética e desenvolvimento a partir das anastomoses entre conídios

Realizou-se micromanipulação de algumas anastomoses, mantendo-se somente aquelas que cresceram em meio com higromicina. Os conídios originados das novas colônias apresentaram-se uninucleados com DAPI. É importante ressaltar que somente foi possível micromanipular anastomoses de tubos curtos. Aquelas de tubos longos ($>10\mu\text{m}$) quebraram-se (Figura 17). Duas em dez micromanipulações não formaram colônias em meio M3S líquido. Das oito restantes, só uma foi resistente à higromicina, a qual foi avaliada com PCR, tirando-se amostras da primeira placa formada pela colônia.

A anastomose original que cresceu e formou esta colônia foi derivada de um complexo de anastomoses formado por quatro conídios. Os corpos de frutificação de onde foram retiradas estas anastomoses originaram-se do encontro entre os isolados H2 e 401 (itêm 4.2.7, segundo parágrafo). A formação de anastomoses foi variável nos diferentes encontros. Em alguns ocorria formação de esporodóquios ou corpos de frutificação e em outros não, mesmo dentro das repetições.

Os resultados de PCR para esta única colônia foram obtidos no mesmo dia, utilizando a mesma mistura de reação e micélios da mesma placa, coletados na mesma área de crescimento para cada amostra. Os resultados mostraram produtos correspondentes aos dois isolados doadores de núcleos (H2 e 401) nas condições desta reação e o da nova colônia formada (Figura 18).

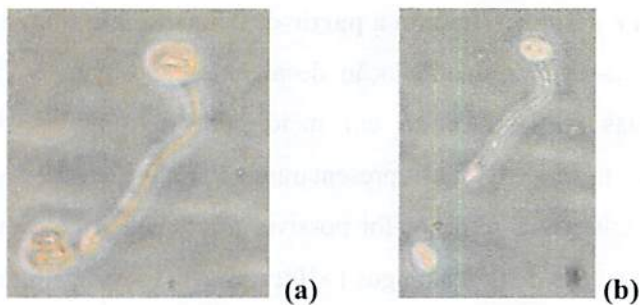


FIGURA 17 (a) Micromanipulação de anastomose de tubo longo; (b) tubo de anastomose rompido após o movimento.

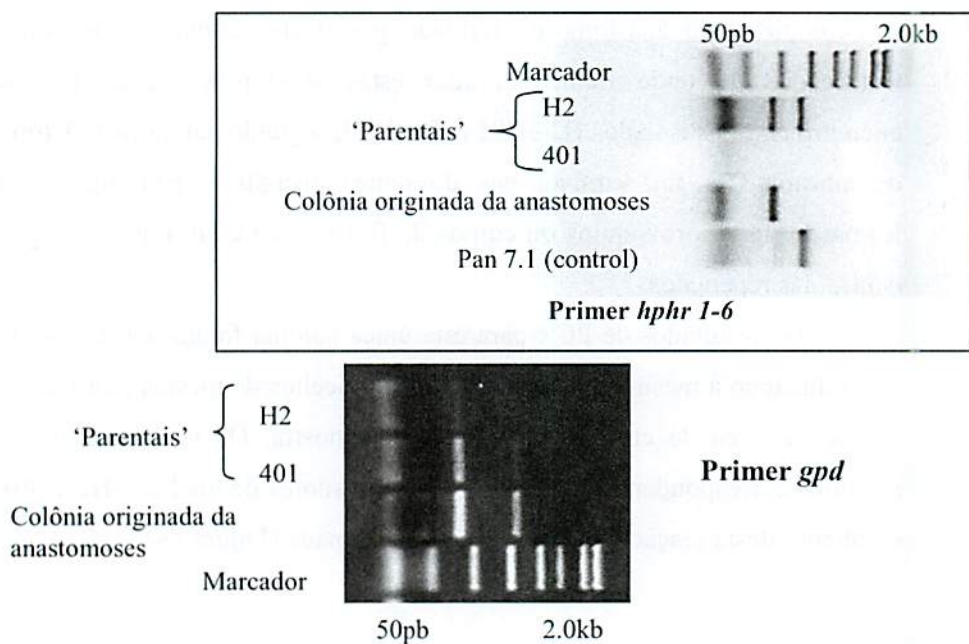


FIGURA 18 PCR da colônia proveniente da anastomose entre quatro conídios e dos 'parentais'.

4.4 DISCUSSÃO

4.4.1 Reprodução assexual em *Colletotrichum lindemuthianum*

O processo de conidiogênese observado neste trabalho assemelha-se àquele tipicamente descrito para o gênero *Colletotrichum* (Sutton, 1966; Maiello, 1988; Alexopoulos, Mims & Blackwell, 1996). Ele implica em crescimento do conidióforo até seu ponto máximo e conseqüente liberação dos conídios. Acérvulos formados de um primórdio circular foram previamente descritos (Maiello, 1988), os quais podem também ser originados de células individuais de hifas.

Considerando-se previamente a ocorrência da dormência em conídios, procurou-se estudar o efeito da camada mucilaginosa na germinação conidial. Verificou-se que a mucilagem envolvendo os conídios retardou substancialmente a germinação dos mesmos. No caso das placas cultivadas na presença dessa substância, a germinação só iniciou-se três dias após inoculação, ao passo que, na ausência de mucilagem, a germinação iniciou-se cerca de três horas a partir da transferência. A ausência de nutrientes no meio pode ter induzido à rápida esporulação, o que permitiu observar claramente, na ausência de muitos novos de hifas, a formação do acérvulo, esporodóqui ou corpo de frutificação. Isso mostra que acérvulos ou grupos de conidióforos podem ser originados de uma ou mais células (Figura 19).

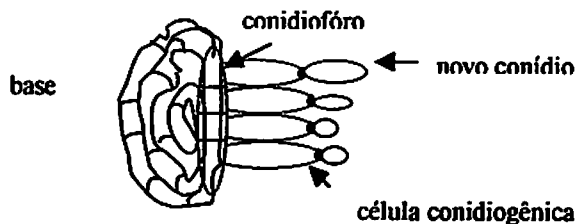


FIGURA 19 Desenho ilustrativo de acérvulos e esporodóquios observados durante a microcultura experimental e no substrato natural (capítulo 1).

4.4.2 Origem e natureza das anastomoses entre conídios

Os resultados encontrados permitiram explorar quatro hipóteses para explicar a natureza das anastomoses, as quais são descritas a seguir.

4.4.2.1 Falhas no processo de conidiogênese

A ocorrência de falhas no processo de conidiogênese poderia resultar na formação de conídios unidos por um tubo, como alongação de um conidióforo, por exemplo. Esta hipótese não procede pois, o processo de conidiogênese foi estudado empregando-se diversas metodologias, diferentes tipos de microscopia, vários isolados e diferentes condições ambientais. Em nenhum dos casos diferiu daquele descrito para a espécie. Além disso, o tubo de anastomose seria alguma conexão remanescente e esta, então, seria facilmente degradada por enzimas da parede celular, o que não ocorreu.

4.4.2.2 Formação de conídios secundários via microciclo

Neste caso, poderiam ser formados conídios secundários, partindo de conídios primários ou algum tipo de microciclo de esporulação. A presença de cicatrizes reveladas por meio de MEV, em ambos os conídios, apresentando

anastomose, indica ocorrência de conidiogênese prévia (Capítulo 2). Também a presença de mais de dois tubos (três, Figura 20) por conídio, quando estão em cadeia, indica que, caso esteja ocorrendo alguma emissão de um conídio secundário, esta só poderia se dar com a contribuição de dois conídios (Figura 20). Dessa forma, não poderia ser simplesmente um processo de reprodução assexual, como os brotamentos observados em algumas espécies de fungos (Capítulo 1, Snetseclar & Mims, 1992). A última evidência para descartar esta hipótese é que nunca foram encontrados conídios de tamanhos intermediários ou pequenos que sugerissem formação e crescimento de novos conídios.

4.4.2.3 Fusão de tubos germinativos

Em alguns casos, pode ocorrer germinação dos conídios e fusão entre tubos germinativos. Esta hipótese também foi descartada, uma vez que as metodologias empregadas permitiram discernir entre tubo germinativo e tubo de anastomose (Figura 9 e capítulo 2). Tubos germinativos, em geral, apresentam entre 4 e 6µm de diâmetro e evoluem para a formação de hifas, ao passo que os tubos de anastomoses são de menor diâmetro (2 a 4µm) e não originam hifas. Vale a pena ressaltar que as condições nas quais os conídios foram depositados para avaliação (fina película de água) assemelham-se mais às condições encontradas pelo patógeno na natureza do que às condições dentro do acérvulo (Bailey *et al.*, 1992; Tu, 1992). Evidencia-se assim mais uma vez que anastomoses podem também ser formadas fora do acérvulo. Observa-se também que a presença de mucilagem não inibiu a formação desses tubos.

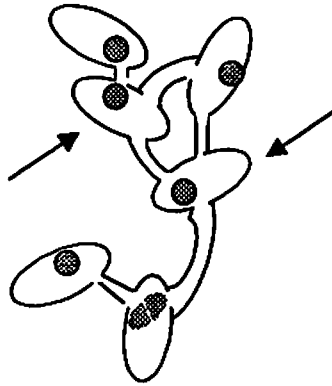


FIGURA 20 Desenho esquemático da foto da Figura 16. Anastomoses entre conídios formando cadeias.

4.4.2.4 Formação de conexões citoplasmáticas

Após análise e rejeição das demais hipóteses, a explicação mais plausível é a formação de estruturas para permitir a conexão entre citoplasmas de conídios. Os dados apresentados neste e nos capítulos anteriores permitem sugerir a ocorrência de uma seqüência de eventos (Figura 21). Embora esta seqüência de eventos tenha sido observada em condições de laboratório, é de se esperar que ela ocorra da mesma forma na natureza, uma vez que resultados similares foram observados quando amostras foram coletadas diretamente do campo (Capítulo 1 e 2). Condições ambientais adversas, como falta de nutrientes, podem estar também relacionadas ao processo, já que estas condições forçam a formação de heterocários em várias espécies de fungos como: *Aspergillus*, *Fusarium*, *Ustilago violacea*, *U. maydis*, *Verticillium albo-atrum* e *Trichoderma* (Pontecorvo, 1956; Molnar, Sulyok & Hornok, 1990; Day & Jones, 1968, Snettselar & Mims, 1992; Hastie, 1967; Stasz & Harman, 1990), e há hipóteses onde se relaciona a falta de nutrientes com a formação de organismos haplóides (Lewis, 1985).

4.4.3 Dinâmica do núcleo nos conídios

4.4.3.1 Conídios livres

Embora em *C. lindemuthianum* tenham sido anteriormente descritos conídios uninucleados (Alexopoulos *et al.*, 1996; Roca, 1997), não há surpresa na ocorrência de conídios bi e/ou polinucleados uma vez que este evento já foi relatado para outras espécies do gênero *Colletotrichum* (TeBeest *et al.*, 1989; Mendes-Costa *et al.*, 1998; Takano *et al.*, 2001). Entretanto, vale salientar que nos trabalhos onde conídios binucleados foram encontrados, os conídios não eram frescos (TeBeest *et al.*, 1989; Mendes-Costa *et al.*, 1998) ou então agentes tóxicos foram utilizados (Takano *et al.*, 2001). Do mesmo modo, sabe-se que em *C. lindemuthianum* a viabilidade dos conídios decresce significativamente a partir dos dez dias de idade (observações pessoais e comunicação pessoal, Jane Williams, Universidade de Bath-UK), o que pode estar associado à formação de conídios anucleados. Esta observação dá respaldo aos dados apresentados nas Tabelas 6 e 7, ou seja, a frequência de conídios binucleados ou polinucleados elevou-se simultaneamente à medida que a frequência de conídios anucleados aumentava. O aumento do número de núcleos estaria relacionado à divisão nuclear e/ou doações recebidas e os anucleados foram consequência de degeneração nuclear e/ou doações realizadas. Veja ainda que, mesmo alterando-se as condições de fotoperíodo, a sequência de eventos permanece a mesma, porém, com ligeiras diferenças na velocidade, o que foi verificado em outros fungos (Aronson *et al.*, 1994).

Comparações do volume de DNA nuclear foram realizadas utilizando-se suspensões de células e não cortes histológicos, como sugerido na literatura (Chicco *et al.*, 2001). Diferenças substanciais foram observadas entre diferentes núcleos, em conídios uninucleados e nas anastomoses. Essa variação no conteúdo de DNA pode tanto ser devida à duplicação no início da mitose ou,

então, a diferentes níveis de ploidia (Tabela 10), originados de diversas formas possíveis, como fusão de núcleos e/ou rearranjo de genoma. Com o objetivo de se obter uma comparação mais próxima da realidade, foram considerados apenas núcleos interfásicos, sendo as comparações feitas dentro de lâminas preparadas e avaliadas no mesmo dia. Igualmente, não foram realizadas medições das áreas dos núcleos em conídios com menos de dez dias (frescos). Parecem existir diferenças na espessura da parede celular dos conídios frescos, uma vez que a penetração do corante foi desigual.

Na Tabela 10 verificam-se os dados relativos da área. A média geral ($3,5 \mu\text{m}^2$) corresponde praticamente à área nuclear observada durante a fase G2 da intérfase. Sabe-se que conídios em dormência encontram-se em G1 em vários fungos (Bos, 1985). Neste caso, a possibilidade dos conídios encontrarem-se em dormência é mínima, uma vez que as amostras estavam com vinte dias de idade.

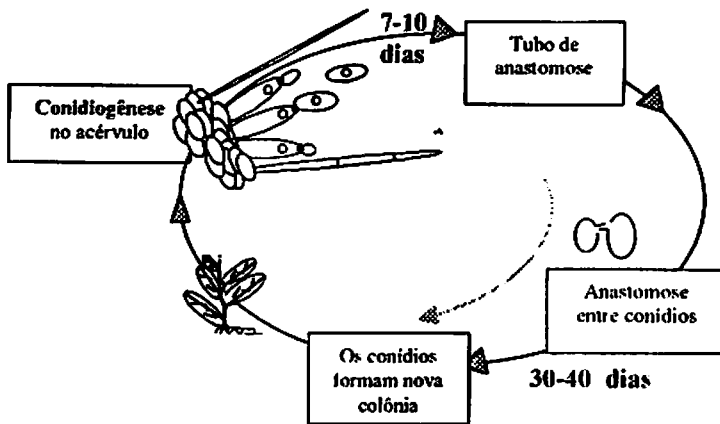


FIGURA 21 Modelo proposto para explicar o ciclo assexual de *C. lindemuthianum* e momento da formação das anastomoses entre conídios.

Algumas imagens sugerem fragmentação do núcleo e produção de micronúcleos (Figura 12b), embora os micronúcleos possam ser originados por diferentes fatores, como cromossomos atrasados durante as mitoses nos conidióforos, quebra ou perda de alguns cromossomos durante as fases de metáfase/anáfase mitótica dos conídios (razão pela qual apresentam um único núcleo antes do final da mitose com aspecto diferente ao interfásico). Relatos da formação de micronúcleos existem, tanto para espécies animais como vegetais, e estão relacionados, principalmente, à perda de material cromossômico (Matsumoto & Cólus, 2000, Baptista-Giacomelli *et al.*, 2000a, b). Estes também poderiam estar relacionados ao uso de agentes químicos no processo de fixação, por exemplo. Porém, imagens semelhantes foram encontradas com diferentes metodologias de coloração em trabalhos anteriores (Roca, 1997) e inclusive sem fixação (com DAPI). Provavelmente, mitose catastrófica não foi o fator responsável pela geração de micronúcleos, podendo, porém, em alguns casos, ter causado a formação de conídios anucleados, conforme sugerido pelas imagens observadas, corroborando com o que tem sido observado em outras espécies (Kulilk & Dery, 1995). O formato arredondado dos micronúcleos no citoplasma sugere a existência de alguma membrana com função de proteger o DNA contra a ação de endonucleases citoplasmáticas.

4.4.3.2 Conídios em anastomoses

De acordo com os dados apresentados nas Tabelas 4 a 6 e Figuras 13 e 14, pode-se sugerir uma seqüência de eventos durante o processo de esporulação, mesmo que o movimento do núcleo 'in vivo' não tenha sido acompanhado. As diferentes posições e números de núcleos nos levam a inferir a ocorrência de migração e ou divisão nuclear, especialmente nos casos em que foram encontrados dois ou mais conídios conectados por anastomoses e um único núcleo presente. O'Sullivan *et al.* (1998) mostraram ocorrência de

rearranjo de genoma em conídios de *C. lindemuthianum*, o qual poderia ter sido resultado da divisão ocorrida no conidióforo (mitose) e/ou algum tipo de rearranjo ocorrido tardiamente, via anastomoses entre conídios.

A seqüência de eventos foi similar nos dois isolados e nas diferentes condições. Para as diferentes situações, a formação de anastomoses ocorre justamente a partir do momento em que conídios anucleados, bi e/ou polinucleados passam a ser observados. Embora tenham sido verificados todos esses eventos de forma clara e aparentemente associados, não é possível afirmar com clareza se a mitose só é responsável pelo aumento do número de núcleos ou se a formação de anastomoses entre conídios é responsável por induzir divisão nuclear e resultar em células com diferentes números de núcleos. No caso de ausência de núcleos, sugere-se migração, porém conídios anucleados também foram vistos em cadeia de anastomoses. Esse fato não permite inferir quantos 'fragmentos' teriam migrado, nem tampouco quem ocorreu primeiro, se a anastomose ou a divisão nuclear.

4.4.4 Troca de material genético e anastomoses entre conídios

A descoberta de uma nova forma de anastomose citoplasmática entre conídios confere respaldo às hipóteses da geração de variabilidade genética via meios assexuais em *C. lindemuthianum*, como sugerido por Brygoo *et al.* (1998). A troca de material genético parece estar relacionada à dinâmica das anastomoses, considerando as cadeias que são formadas. Várias hipóteses surgem. Porém, observando-se todos os eventos encontrados e representados na Figura 15, não se pode sugerir nenhum modelo, embora pareça clara a migração de núcleos por meio das anastomoses (Figura 14 b), o que está de acordo com as imagens sugestivas de migração de núcleo apresentadas por Roca (1997).

Em *C. gloeosporioides*, Masel *et al.* (1996) sugeriram que ocasional transferência de alguns cromossomos entre isolados mitospóricos ocorre de

forma hereditária (He *et al.*, 1998). Estes autores observaram unicamente a presença de conídios uninucleados, descartando, portanto, a possibilidade de heterocários. Da mesma forma que anastomoses foram encontradas entre *C. gloeosporioides* (isolado de café) e *C. gossypii*, também poderia ser esperado para outras espécies de *Colletotrichum*.

Anastomoses entre hifas têm sido bem documentadas para fungos filamentosos e conhecida por sua importância na formação de heterocários e diplóides (Jacobson *et al.*, 1997; Saupe, 2000; Glass *et al.*, 2000). Então, como isolados vegetativamente incompatíveis poderiam formar anastomoses entre conídios? Isto poderia ser explicado pelo fato dos tubos de anastomoses serem estruturas diferentes dos tubos germinativos e, portanto, de hifas, que seriam o primeiro passo para ocorrer compatibilidade vegetativa (Glass *et al.*, 2000). Bryson (1990) obteve resultados positivos para a formação de peritécios dispersos nas placas após a mistura de conídios, ao contrário do que era esperado, ou seja, formação na região de encontro dos isolados.

Da mesma forma, os experimentos com microcultura, realizados com isolados de espécies diferentes (H2 de *C. lindemuthianum* e *C. gossypii*), mostram que acérvulos diferentes, estando próximos, possibilitariam a formação de anastomoses longas entre conídios localizados na região periférica dos acérvulos (Figura 22). Além disso, os resultados do capítulo 3 mostram que isolados com características fenotípicas diferentes podem ser gerados, mesmo sendo incompatíveis vegetativamente.

Os eventos citológicos apresentados mostram uma complexa dinâmica do núcleo nos conídios e também quando conectados pelas anastomoses, o que denota não serem simplesmente esporos dormentes. As anastomoses fornecem uma oportunidade para genótipos diferentes se encontrarem e trocarem material, como mostram os resultados de PCR originados da colônia formada da anastomose. A nova colônia apresenta características encontradas em ambos os

isolados (401 e H2). Não foi possível determinar o número de núcleos presentes nos conídios em anastomose (originalmente micromanipulada), porém os conídios produzidos com base nessa microcultura eram uninucleados. Pelos resultados de PCR ve-se que ainda poderia estar ocorrendo rearranjo de genoma nos isolados o que explica bandas de diferentes tamanhos presentes no isolado H2 e, diferentemente na nova colônia. Ele pode ser produto de alguma deleção durante um processo de divisão celular na nova colônia, porém, também poderia ser pelo número de cópias inseridas no isolado H2, no momento da transformação.

Finalmente, pôde-se observar que muitas informações podem ser obtidas do ciclo assexuaal desta espécie. Partindo das diferenças entre conídios considerados células em dormência, somente com função propagativa e infecciosa da espécie, verifica-se que são células com intensa atividade e que têm papel fundamental na sobrevivência da espécie, não só como um esporo assexuaal e todos idênticos, mas, sim, expressando variabilidade. Muitas perguntas surgem após tantos resultados e mais estudos envolvendo genética e citogenética deveriam continuar sendo realizados.

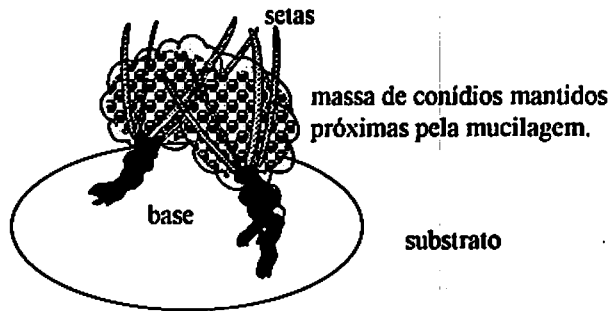


FIGURA 22 Representação esquemática de corpos de frutificação ou esporodóquios próximos, em meio de cultura. No substrato natural, embora a presença da epidermis da planta e a difícil distinção da base do acérvulo (chamado de esporódoquio quando ocorre em meio de cultura), quando as lesões estão avançadas, ocorre contato entre conídios de diferentes acérvulos.

4.5 CONCLUSÕES

As anastomoses entre conídios acontecem durante o ciclo assexual de *C. lindemuthianum*, dando a oportunidade para genótipos diferentes da espécie encontrarem-se num complexo comum (complexo formado pelas anastomoses). Esse fato permite o surgimento de fenótipos diferentes, com base em outros preexistentes.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. **Introductory mycology**. 4.ed. New York: J. Wiley and Sons, 1996. 866p.

ARCE-MONTOYA, M. ; SÁNCHEZ-GARZA, M. ; SIMPSON, J. Polimorfismo en el cariotipo molecular de aislados mexicanos de *Colletotrichum lindemuthianum*. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v. 16, p. 110, 1998.

ARONSON, B.D.*et al.* Negative feedback defining a circadian clock: autoregulation of the clock gene frequency. **Science**, v. 263, p. 1533-1656, Mar. 1994.

BAILEY, J.A.*et al.* Infection strategies of *Colletotrichum* species. In: BAILEY, J.A.; JEGER, M. J. (Ed.). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Wallingford: C.A.B. International. 1992. p.88-120.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. Elimination of micronuclei from microspores in a Brazilian oat (*Avena sativa* L.) variety. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 3. p. 681-684, 2000a.

BAPTISTA-GIACOMELLI, F.; PAGLIARINI, M.S.; ALMEIDA, J.L. Meiotic behavior in several brazilian oat cultivars (*Avena sativa* L.). **Cytologia**, v. 65, p. 371-378, 2000b

BRYGOO, Y. *et al.* Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. Reproduction and population structure in phytopathogenic fungi. In: BRIDGE, P.; COUTEAUDIER, Y.; CLARKSON, J. (Ed.). **Molecular variability of fungal pathogens**. Wallingford: CAB International, 1998. p. 133-148.

BRYSON, R. J. **Sexual hybridisation and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum***. 1990. 250p. (PhD Thesis)-University of Birmingham, Birmingham.

BOS, C. J. **Induced mutation and somatic recombination as tools for genetic analysis and breeding of imperfect fungi**. 1985. 86p. (Ph.D. Thesis)-Wageningen Agricultural University, Wageningen.

CENTIS, S. *et al.* Endopolygalacturonase genes from *Colletotrichum lindemuthianum*: cloning of *CLPG2* and comparison of its expression to that of *CLPG1* during saprophytic and parasitic growth of the fungus. *Molecular and Plant-Microbe Interaction*, v.10, p.769-775, 1997.

CHIECO, P.; JOUKER, A.; VANNOORDEN, C.J.F. *Image cytometry*. Oxford: BIOS, 2001. 110p.

DAY, A.W.; JONES, J.K. The production and characteristics of diploids in *Ustilago violacea*. *Genetic Research*, Cambridge, v.11, n.1, Feb. 1968

DUMAS, B. *ET AL.* Use of green fluorescent protein to detect expression of an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum lindemuthianum* during bean infection. *Applied and Environmental Microbiology*, v.65, n.4, p. 1769-1771, 1999.

GLASS, N.L.; JACOBSON, D.J.; SHIU, P.K. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. *Annual Review of Genetics*, v.34, p. 165-186, 2000.

GONZÁLES, M. *et al.* Characterization of Mexican Isolates of *Colletotrichum lindemuthianum* by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology*, v. 88, p. 292-299, 1998.

HASTIE, A.C. Mitotic recombination in conidiophores of *Verticillium albo-atrum*. *Nature*, London, v.214, p. 240-252, Apr. 1967.

HAUGLAND, R.P. *Handbook of fluorescent probes and research chemicals*. 6.rd.edn. Eugene: Molecular Probes, 1996. 210p.

HE, C. *et al.* *Cg T1*: a non-LTR retrotransposon with restricted distribution in the fungal phytopathogen *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular General Genetics*, v.252, p.320-331, 1996.

HE, C. *et al.* Transfer of a supernumerary chromosome between vegetatively incompatible biotypes of the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Genetics*, v.150, p. 459-466, 1998.

JACOBSON, D.J.; BEURKENS, K.; KLOMPARENS, K.L. Microscopic and ultrastructural examination of vegetative incompatibility in partial diploids heterozygous at *het* loci in *Neurospora crassa*. *Fungal Genetics and Biology*, v.23, p. 45-56, 1998.

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.

KULIK, M. M.; DERY, P.D. Use of DAPI for anastomosis group typing of strains of the fungus *Rhizoctonia solani*. *Biotechnic and Histochemistry*, v. 70, n. 2, p.95-98, Mar. 1995.

LEWIS, W.M. Nutrient scarcity as an evolutionary cause of haploidy. *The American Naturalist*, Chicago, v. 125, n.5, p. 693-701, May 1985.

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.

MAIELLO, J. M. Acervulus initiation in *Colletotrichum capsici*. *Mycologia*, v. 80, p.410-413, 1988.

MANNERS, J.; BAMPTON, S.S. Fusion of uredospore germ tubes in *Puccinia graminis*. *Nature*, London, v.179, p.483-484, 1957.

MASEL, A. M. *et al.* Molecular evidence for chromosome transfer between biotypes of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, St. Paul, v.95, n.5, p.339-348, 1996.

MATSUMOTO, F.E.; CÓLUS, I.M.S. Micronucleus frequencies in *Astyanax bimaculatus* (Characidae) treated with cyclophosphamide or vinblastine sulfate. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 23, n.2, p.489-492, 2000.

MENDES-COSTA, M.C. Genetics of *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli* 1. 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, L. C.; ROCA M., M. G. 'In vitro' cytology of *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Scrib. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 22, p. 250-253, 1998.

MOLNAR, A.; SULYOK, L.; HORNOK, L. Parasexual recombination between vegetatively incompatible strains in *Fusarium oxysporum*, *Mycological Research*, v.94, n.3, p.393-398, 1990.

O'SULLIVAN, D. *et al.* Variation in genome organization of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Current Genetics*. v.33, p.291-298, 1998.

PERFECT, S. E.; HUGHES, H. B.; O'CONNELL, R. J.. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genetics and Biology*, v. 27, p. 186-198, 1999.

PONTECORVO, G. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology*, Palo Alto, v.10, p.393-400, 1956.

PUNT, P.J. *et al.* Transformation of *Aspergillus* based on the hygromycin B resistance marker from *Escherichia coli*. *Gene*, v. 56, p.117-124, 1987.

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.; SARTORATO, A. Antracnose. In: RAVA, A.C.; SARTORATO, A. (Ed.). *Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle*. Brasília: EMBRAPA, 1994. p.17-40.

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

SAUPE, S.J. Molecular genetics of heterokaryon incompatibility in filamentous ascomycetes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v. 64, n.3, p.489-502, Sept. 2000.

SCHREIBER, L.R.; GREEN JR, R.J. Anastomosis in *Verticillium albo-atrum* in soil. *Phytopathology*. St. Paul, v.56, p.1110-1111, 1966.

SICARD, D.*et al.* Genetic diversity and pathogenic variation of *Colletotrichum lindemuthianum* in the three centres of origin of its wild host *Phaseolus vulgaris*. *Phytopathology*, v.87, p.807-813, 1997.

SNETSELAAR, K.M.; MIMS, C.W. Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, v.84, n.2, p.193-203, Mar./Apr. 1992.

STASZ, T. E.; HARMAN, G. E. Nonparental progeny resulting from protoplast fusion in *Trichoderma* in the absence of parasexuality. *Experimental Mycology*, v. 14, p. 145-159, 1990.

SUTTON, B. C. Development of fructifications in *Colletotrichum graminicola* (Ces.) Wills. and related species. *Canadian Journal of Botany*, v.44, p. 887-897, 1966.

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.

TAKANO, Y.; OSHIRO, E.; OKUNO, T. microtubule dynamics during infection-related morphogenesis of *Colletotrichum lagenarium*. *Fungal Genetics and biology*, v.10, p.1-15, 2001.

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. An improved Mathur's medium for growth, sporulation and germination of spores of *Colletotrichum lindemuthianum*. *Microbios*, v. 44, p. 87-93, 1985.

TU, J.C. *Colletotrichum lindemuthianum* on Bean: Population dynamics of the pathogen and breeding resistance. 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.