



ANA CAROLINA FARIA MARTINS

BROTAMENTO DE ASCÓSPOROS EM *Colletotrichum lindemuthianum*

Lavras-MG

2022

ANA CAROLINA FARIA MARTINS

BROTAMENTO DE ASCÓSPOROS EM *Colletotrichum lindemuthianum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do Título de Mestre.

Profa. Dra. Elaine Aparecida de Souza

Orientadora

Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa

Coorientadora

LAVRAS-MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Martins, Ana Carolina Faria.

Brotamento de ascósporos em *Colletotrichum lindemuthianum* /
Ana Carolina Faria Martins. - 2022.
47 p. : il.

Orientador(a): Elaine Aparecida de Souza.

Coorientador(a): Maria Cristina Mendes Costa.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Antracnose. 2. *Colletotrichum* spp. 3. Brotamento. I. de
Souza, Elaine Aparecida. II. Costa, Maria Cristina Mendes. III.
Título.

ANA CAROLINA FARIA MARTINS

BROTAMENTO DE ASCÓSPOROS EM *Colletotrichum lindemuthianum*

ASCOSPORES BUDDING IN *Colletotrichum lindemuthianum*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, para obtenção do Título de Mestre.

Aprovada em 11 de fevereiro de 2022

Dr. Elaine Aparecida de Souza

Dra. Maria Cristina Mendes Costa

Profa. Dra Elaine Aparecida de Souza

Orientadora

Profa. Dra. Maria Cristina Mendes Costa

Coorientadora

LAVRAS-MG

2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar e abençoar minhas caminhadas.

A minha família (Solange, Sergio, Pedro, Maya e Nino) por toda paciência, apoio e carinho. Pedro, meu irmão, trouxe muita leveza para este processo.

A Andreia por todas as brincadeiras e por escutar meus desabados.

A toda minha família que está no Rio de Janeiro, mas principalmente aos meus avós (Martinho, Dira e Conceição) por me estimularem e serem um exemplo de força em minha vida.

A professora Elaine pelas grandes ideias, paciência e maravilhosas sugestões.

A professora Maria Cristina que sempre se mostrou disponível a me ajudar, acalmar e principalmente me ensinar - tanto por telefone e reuniões, quanto no laboratório presencialmente.

Aos meus amigos do Laboratório de Resistência de Plantas à Doenças que sempre me auxiliaram em tudo que eu precisei. Em especial Mariana, Fernanda, Miller e Alex.

Ao pessoal da citogenética, principalmente Isabela e Ana, que me ajudaram em uma etapa do meu trabalho.

Ao Silvino e Eduardo pelos auxílios envolvendo a microscopia.

Aos professores por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos meus amigos que me deram muita força durante esse período.

Aos membros da banca por aceitarem o convite.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas e Universidade Federal de Lavras (UFLA)

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

A antracnose do feijoeiro é uma das principais doenças fúngicas que atacam a cultura. A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, forma anamórfica, o qual possui ampla variabilidade assim como sua forma teleomórfica (sexuada). A reprodução sexuada é a principal forma de ampliação da variabilidade genética nos fungos, portanto, o estudo das características morfológicas e de suas estruturas sexuais são importantes. A produção de ascósporos acontece por meio do ciclo meiótico em linhagens homotáticas. No entanto, recentemente tem-se observado a produção de novos ascósporos via mitose após esse ciclo, processo nunca observado antes para o gênero *Colletotrichum*. Como resultado de cada divisão mitótica têm-se a formação de dois ascósporos com morfologia amendoada ou alantóide. Este processo se assemelha ao brotamento de ascósporos observado em espécies de fungo do gênero *Taphrina*. Portanto, o objetivo desse trabalho é estudar e caracterizar o fenômeno aqui descrito como brotamento em ascósporos. Além disso, verificar a possível ocorrência deste fenômeno *in vivo* em plantas crescidas em casa de vegetação. Para tal utilizou-se uma linhagem de *C. lindemuthianum* (UFLA84-1). Para a análise do processo de brotamento foi utilizado o marcador nuclear fluorescente Iodeto de Propídio e a obtenção de imagens por meio m Microscópio Invertido Zeiss Vert A1 de Epifluorescência. Também utilizou-se o Microscópio Eletrônico de Varredura de Ultra Resolução. Utilizando o Microscópio de Luz Invertido realizou-se uma análise citológica por meio de medições de comprimento e largura dos ascósporos alantóides e amendoados, além de obtenção da porcentagem de brotamento. Também foram conduzidos dois experimentos *in vivo* (i: plantas em casa de vegetação e ii: folhas e pecíolos destacados mantidos em BOD) a fim de avaliar a ocorrência de brotamento. Em um experimento *in vitro*, ascósporos alantóides e amendoados foram crescidos em placas com meio BDA, onde foram observados os tipos de colônias formadas. Posteriormente, culturas monoascospóricas foram obtidas com o objetivo de quantificar a porcentagem de brotamento e o número de ascósporos amendoados. Para facilitar o entendimento, o ciclo foi dividido em seis estádios. Foi observado que os ascósporos oriundos da mitose pós meiótica apresentam núcleo com diferentes padrões, sugerindo que estejam em diferentes fases mitóticas. Além disso, o brotamento ocorre apicalmente ou lateralmente. Encontrou-se brotamento em folhas e pecíolos destacados, mas não em plantas mantidas em casa de vegetação. Houve diferença significativa para o comprimento dos ascósporos, sendo os amendoados de menor comprimento. A porcentagem de brotamento foi de 3%. Ampla variabilidade morfológica foi observada em colônias oriundas de ascósporos amendoados e alantóides, sendo em sua maioria periteciais. As colônias oriundas de ascósporos amendoados apresentaram maior taxa de brotamento do que aquelas provenientes de ascósporos alantóides. Novas pesquisas devem ser realizadas a fim de compreender melhor os mecanismos biológicos responsáveis por esse fenômeno, bem como a realização de novas avaliações em casa de vegetação e em nível citológico.

Palavras-chave: Antracnose; *Colletotrichum* spp.; Brotamento; Ascósporos

ABSTRACT

Common bean anthracnose is one of the main fungal that causes disease in crop. The disease is caused by the fungus *Colletotrichum lindemuthianum*, anamorphic form, which has wide variability as well as the teleomorphic (sexual) form. Sexual reproduction is the main ways of increasing genetic variability in fungi, therefore, the study of morphological traits and their sexual structures are important. The production of ascospores occurs through a meiotic cycle in homothallic strains. However, it the production of new ascospores via mitosis after this cycle, a process never observed before for the genus *Colletotrichum*, has recently been observed. As a result of each mitotic division, two ascospores with almond or allantoid morphology are formed. This process resembles the ascospore budding observed in fungal species of the genus *Taphrina*. Therefore, the objective of this work is to study and characterize the phenomenon described as budding in ascospores. In addition, the possible presence of this phenomenon *in vivo* in plants grown in a greenhouse was investigated. For this purpose, a strain of *C. lindemuthianum* called 84-1 was used. Analyses of budding process in ascospores was carried out using the fluorescent nuclear marker Propidium Iodide and images were obtained with a Fluorescence Microscope. The Ultra high resolution scanning electron microscope was also used. Cytological analysis was performed by measuring the length and width of the allantoid and almond-shaped ascospores, in addition to obtaining the percentage of budding using the inverted Zeiss Vert.A1 microscope. Two *in vivo* experiments were also carried out (i: plants in a greenhouse and ii: detached leaves and petioles kept in BOD) in order to evaluate the occurrence of budding. In an *in vitro* experiment, allantoid and almond-shaped ascospores were grown on plates with PDA medium, where the types of colonies formed were observed. Subsequently, monoascosporic cultures were obtained in order to quantify the budding percentage and the number of almond-shaped ascospores, the budding cycle was divided in six stages to better understanding. It was observed that the ascospores from post-meiotic mitosis have a nucleus with different patterns, suggesting that they are in different mitotic phases. In addition, budding occurs apically or laterally. Budding was found on detached leaves and petioles, but not on plants kept in greenhouse. significant difference was found in the length of the ascospores, with the almonds being shorter. Percentage of budding was 3%. Morphological variability was observed in colonies originating from almond-shaped and allantoid ascospores, being mostly peritethial. Finally, colonies from almond-shaped ascospores had a higher budding percentage than those from allantoid ascospores. New research should be carried out in order to better understand the biological mechanisms responsible for this phenomenon, as well as new evaluations in greenhouse and at the cytological level.

Keywords: Anthracnose; *Colletotrichum* spp.; Budding; Ascospores

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sinonímia: <i>Glomerella cingulata</i> f. sp. <i>phaseoli</i>) ...	10
2.2 Reprodução sexual	13
2.3 Brotamento em fungos	16
2.3.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	16
2.3.1 <i>Taphrina</i> spp.	19
3 MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1 Origem da linhagem.....	21
3.3 Análise do processo do brotamento	21
3.4 Análise citológica de ascósporos e porcentagem de brotamento.....	22
3.5 Análise do “brotamento” <i>in vivo</i>	23
3.6 Tipo de colônia oriunda de ascósporos alantoides e amendoados	24
3.7 Porcentagem de brotamento e de ascósporos amendoados	24
3.7 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	26
4.1 Idade da colônia e porcentagem de brotamento.....	26
4.2 Análise do processo do brotamento	27
4.3 Análise citológica de ascósporos e porcentagem de brotamento.....	28
4.4 Análise do “brotamento” <i>in vivo</i>	28
4.5 Tipo de colônia oriunda de ascósporos alantoides e amendoados	29
4.6 Porcentagem de brotamento e de ascósporos amendoados	31
5 DISCUSSÃO	32
6 CONCLUSÕES	36

1 INTRODUÇÃO

A antracnose do feijoeiro é uma das principais doenças fúngicas que atacam a cultura (PAULA JÚNIOR; WENDLAND, 2012). A doença é causada pelo fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, forma anamórfica, o qual possui ampla variabilidade (PINTO et al., 2012), assim como, sua forma teleomórfica, *Glomerella cingulata* (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007).

A reprodução sexuada é considerada a principal forma de ampliação da variabilidade genética nos fungos (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007). A reprodução sexual de linhagens teleomórficas de *Colletotrichum* spp. têm sido estudadas em algumas oportunidades (BAILEY; JEGER, 1992; KIMATI; GALI, 1970; BRYSON, 1980; BARCELOS et al., 2014).

Linhagens homotáticas (CAMARGO-JÚNIOR, 2008; SOUZA; CAMARGO-JÚNIOR; PINTO, 2010; BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017; MARTINS et al., 2019), e heterotáticas (RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2005; KIMATTI; GALI, 1970; BRYSON, 1980) de *Colletotrichum* spp. têm sido observadas na cultura do feijoeiro (RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2005; SOUZA CAMARGO-JÚNIOR; PINTO, 2010; BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS, 2017), esse fato tem aumentado a importância dos estudos das características morfológicas do fungo e de suas estruturas sexuais. Até recentemente a forma sexuada não havia sido encontrada *in vivo* (CAMARGO JÚNIOR, 2008), no entanto, isolamentos de lesões de antracnose e sarna do feijoeiro tem permitido a obtenção de linhagens homotáticas e heterotáticas. Além disso, peritécios têm sido observados em plantas de feijoeiro no final do ciclo, após serem inoculadas e mantidas em casa de vegetação (MARTINS et al., 2019). Portanto, há expectativas para estudos do ciclo sexual do gênero, bem como de informações sobre o seu controle genético.

A multiplicação, via mitose, de ascósporos obtidos a partir do ciclo meiótico de linhagens homotáticas sexuais de *Colletotrichum* spp. do feijoeiro tem sido observada (MENDES-COSTA, comunicação pessoal). Como resultado de cada divisão mitótica têm-se a formação de dois ascósporos, esporos sexuais, com morfologia amendoada ou alantoides. Este processo se assemelha ao brotamento de ascósporos observado para espécies de fungo do gênero *Taphrina*, no qual um ascósporo origina um conídio por brotamento. O processo é cíclico e novos conídios são capazes de gerar novos

brotamentos (UPADHYAY; PAVGI, 1973). O nome utilizado para descrever este fenômeno em *Taphrina* sp. se deve a semelhança ao que ocorre em leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae*. No entanto, em *S. cerevisiae* o brotamento ocorre em esporos assexuais (HERSKOWITS, 1988). Vale ressaltar, o que tem sido observado para o gênero aparentemente não é um processo cíclico, sendo o novo ascósporo formado incapaz de sofrer novos brotamentos. Este fenômeno ainda não foi relatado na literatura para o gênero *Colletotrichum*, portanto, o objetivo desse trabalho é estudar e caracterizar o fenômeno aqui descrito como brotamento em ascósporos de uma linhagem de *C. lindemuthianum*. Além disso será avaliada a possível presença deste fenômeno *in vivo* em plantas crescidas em casa de vegetação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Colletotrichum lindemuthianum* (Sinonímia: *Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*)

O patógeno *C. lindemuthianum* (Sacc. e Magn.) Briosi e Cavara é o agente etiológico da antracnose do feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) (RAVA; SARTORATO, 1994). Este patógeno é um fungo hemibiotrófico intracelular que se reproduz assexuadamente, produzindo conídios hialinos, unicelulares e cilíndricos (KIMATI et al., 1997). Atualmente são aceitas 199 espécies para o gênero *Colletotrichum* (JAYAWARDENA et al., 2016), sendo as espécies do gênero classificadas em 14 complexos (MARIN-FELIX et al., 2017; DAMM et al., 2019).

A fase teleomórfica (sexual) do patógeno foi descrita pela primeira vez em 1913 por Shear e Wood e era usualmente denominada como *Glomerella lindemuthiana* Shear (sin. *G. lindemuthianum*, *G. cingulata* (Stonem.) Spauld. et Schrenk f. sp. *phaseoli*). No entanto, alterações foram estabelecidas pelo Código Melbourne de 2013 a respeito do Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas. De acordo com o novo código, será adotado um único nome para fungos pleomórficos (www.iapt-taxon.org/nomen/main.php). Sendo assim, para o gênero será utilizado *Colletotrichum*, tanto para fase sexual como para fase assexual. A fase teleomórfica pertence à classe dos Ascomycetos (KIMATI; GALLI, 1970, SUTTON, 1992) e produz peritécios e ascos, dentro dos quais se originam os esporos denominados ascósporos (KIMATI; GALLI, 1970). Os peritécios são os corpos de frutificação que possuem forma abaulada, diâmetro variável, coloração hialina e se tornam enegrecidos do ápice para a base em seu processo de amadurecimento. Em média possuem um diâmetro de 85 a 300 μm , onde são produzidos aproximadamente 30 ascos, medindo em média 60 x 8 μm . Estes contêm de um a oito ascósporos, sendo classificados em elipsoidais (10 x 4 μm) ou alantoides (20 x 6,5 μm) (BAILEY; JEGER, 1992; KIMATI; GALLI, 1970).

Barcelos et al. (2014), caracterizando linhagens de sexuais de *Colletotrichum* oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro, observaram que as dimensões dos ascósporos variavam de 6,32 a 9,2 μm para largura, e de 20,5 a 32,78 μm para comprimento. Dimensões semelhantes foram obtidas por Roca, Davide e Mendes-Costa (2003) e Souza, Souza e Mendes-Costa (2007), principalmente quanto ao limite inferior. Os ascósporos apresentaram tamanho médio de 21,7 μm de comprimento e 5,76 μm de largura. No entanto, Castro, Mendes-Costa e Souza (2006) identificaram ascósporos

mutantes, os quais possuíam dimensão média de 15,1 μm de comprimento e 4,4 μm de largura, ambos valores abaixo dos encontrados por outros autores. Posteriormente, Martins et al. (2019) também observaram a presença de dimorfismo para os ascósporos de linhagens de sexuais de *Colletotrichum*, variando de 16,9 a 21,7 μm de comprimento e 5,6 a 6,4 μm de largura, considerando a análise realizada *in vitro*. Valores semelhantes aos encontrados por Roca, Davide e Mendes-Costa (2003) e Souza, Souza e Mendes-Costa (2007), Barcelos et al. (2014).

Espécies do gênero *Colletotrichum* podem ser classificadas como homotáticas (autofértil) ou heterotáticas (autoestéril) (BAILEY; JEGER, 1992; VAILLANCOURT et al., 2000). Linhagens heterotáticas do feijoeiro têm sido caracterizadas a partir de lesões de antracnose (KIMATTI; GALI, 1970; BRYSON, 1980; RODRÍGUEZ-GUERRA et al., 2005), assim como linhagens homotáticas (CAMARGO-JÚNIOR et al., 2007; SOUZA; CAMARGO-JÚNIOR; PINTO, 2010, BARCELOS et al., 2014; MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017; MARTINS et al., 2019). Embora a ocorrência rara do ciclo sexual na natureza ser relatado na literatura, isolamentos frequentes de linhagens teleomórficas do gênero *Colletotrichum* a partir de lesões de antracnose do feijoeiro têm sido realizados no Brasil, o que viabiliza suas caracterizações morfológicas, patogênicas e moleculares (MENDES-COSTA, 1996, ROCA, DAVIDE E MENDES-COSTA, 2003, CAMARGO JÚNIOR et al. 2007, SOUZA; CAMARGO-JÚNIOR; PINTO, 2010, ISHIKAWA et al. 2010a, BARCELOS et al. 2014, MARTINS et al. 2019).

Souza, Camargo-Júnior e Pinto (2010) inocularam linhagens teleomórficas do gênero *Colletotrichum* oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro em 12 cultivares diferenciadoras e observaram que as linhagens não geraram sintomas. De acordo com Barcelos et al. (2014) as linhagens teleomórficas oriundas de lesões de antracnose do feijoeiro foram classificadas em dois grupos. Para isso foram utilizados primers específicos para região HMG e realizada a avaliação de sintomas quando as linhagens eram inoculadas. Um dos pares de primers (HMGCl) utilizados foram desenvolvidos por García-Serrano et al. (2008) e são específicos para a região HMG do gene mating-type MAT1-2-1 que amplificam para isolados de *C. lindemuthianum*. O segundo par de primers (HMGglo) foram desenvolvidos por Barcelos; Souza e Vaillancourt (2011) e amplificam para a região HMG do gene mating-type MAT1-2-1, o qual foi utilizado para identificar linhagens teleomórficas de *Colletotrichum*.

O grupo I foi identificado como aquelas linhagens que amplificaram para primers da região HMG específicos para a fase sexual de *Colletotrichum* (HMG_{glo}) e não amplificaram para primers da mesma região de *C. lindemuthianum* (HMG_{CL}). Além disso, não geraram sintomas quando inoculados no feijoeiro e não esporularam em meio de cultura M3. O grupo II inclui linhagens que não amplificaram para ambos os primers específicos da região HMG, geraram sintomas brandos no feijoeiro e esporularam quando crescidos em vagens de feijão esterilizadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Mota et al. (2016), onde linhagens sexuais de *Colletotrichum* foram estudadas. No entanto, Dias et al. (2017) observaram que linhagens oriundas de lesões de antracnose apresentaram médias elevadas de severidade da doença quando inoculadas em plantas de feijoeiro e não amplificaram para nenhum dos primers utilizados, ou seja, linhagens do grupo II.

Em um estudo desenvolvido por Ishikawa et al. (2010a) concluíram que as diferenças quanto aos sintomas gerados pela fase sexual e assexual não são devido a eventos pré-penetração. As diferenças poderiam ser atribuídas a estruturas pós penetração. (ISHIKAWA et al., 2010a).

Importante destacar que Martins et al. (2019) inocularam uma suspensão de conídios e ascósporos de linhagens teleomórficas de *Colletotrichum* spp. em cultivares de feijoeiro e identificaram a presença de peritécios em folhas úmidas e senescentes de plantas mantidas em casa de vegetação. Essas estruturas também foram identificadas em folhas e pecíolos destacados mantidos em incubadora BOD. Esses resultados corroboram com a teoria de que a fase sexual pode estar presente no campo.

As espécies do gênero *Colletotrichum* apresentam ampla variabilidade quanto a caracteres moleculares, morfológicos e patogênicos (SOUZA; SOUZA; MENDES-COSTA, 2007; PINTO et al., 2012; ISHIKAWA et al., 2016; MOTA et al., 2016; DIAS et al., 2017). A grande variabilidade do gênero é oriunda de diversos mecanismos como mutação, ciclo parassexual (AZEVEDO, 1976; MENEZES, 2006), elementos transponíveis, mutações pontuais induzidas por repetição (GAN et al., 2013; O'CONNELL et al., 2012; DA SILVA et al., 2020), anastomose entre hifas e anastomose entre conídios (CATs) (ISHIKAWA et al., 2010a). A reprodução sexual é considerada uma das principais formas de ampliação da variabilidade genética nos fungos (VAILLANCOURT; WANG; HANAU, 2000), já que permite a união de diferentes alelos em um mesmo indivíduo, o que viabiliza a formação de novas combinações.

2.2 Reprodução sexual

A reprodução sexual envolve a junção de dois núcleos distintos (dicarions) em um mesmo citoplasma e posterior meiose, restaurando a haploidia (AZEVEDO, 1987). Os primeiros estudos da reprodução sexual para a fase teleomórfica do gênero *Colletotrichum* foram realizados por Edgerton (1912; 1914). Souza et al. (2010) comparando taxas de diversidade entre populações sexuais e assexuais, concluíram que a recombinação possui um papel de grande importância na variabilidade do gênero. Além disso, sugere-se que a reprodução sexual no campo seja mais frequente do que se acreditava (CAPELLE; NEEMA, 2005).

Para a maioria dos fungos filamentosos, o controle genético da reprodução sexual em Ascomicetos envolve um sistema controlado por um gene denominado “mating type” (MAT), o qual possui dois idiomorfos (MAT1-1 e MAT1-2) (COPPIN et al., 1997; YUN et al., 1999; NI et al., 2011; DEBUCHY et al., 2010; XU et al. 2016; YUN, 2017). No entanto, este sistema aparentemente não se encaixa para a fase sexual do gênero *Colletotrichum* (KIMATI; GALI, 1970; BATISTA; CHAVES, 1982), podendo haver espécies ambíguas dentro do gênero (BAILEY; JEGER, 1992).

De acordo com Kimati e Gali (1970), Bryson (1990) e Rodríguez-Guerra et al. (2005), o fungo seria heterotático. Mendes-Costa (1996) realizando pareamentos entre ascósporos de três linhagens teleomórficas do gênero, oriundos do mesmo asco, observou incompatibilidade em todas as combinações possíveis. Posteriormente, Souza et al. (2010), utilizando cinco populações teleomórficas de *Colletotrichum*, também observou incompatibilidade para todos os pareamentos. Camargo-Júnior et al. (2007) também observaram incompatibilidade para a maioria dos pareamentos. Porém por meio de um cruzamento compatível foi possível verificar a presença de linhagens recombinantes, utilizando a técnica molecular de Amplificação Aleatória de DNA Polimórfico (Randomly amplified polymorphic DNA - RAPD). Estas linhagens apresentaram morfologias e comportamentos sexuais contrastantes, visto que algumas possuíam comportamento homotático e outras, heterotático (CAMARGO-JÚNIOR et al., 2007). Já Barcelos et al. (2014) observaram que a compatibilidade sexual ocorria apenas quando havia pareamento de linhagens periteciais e conidiais.

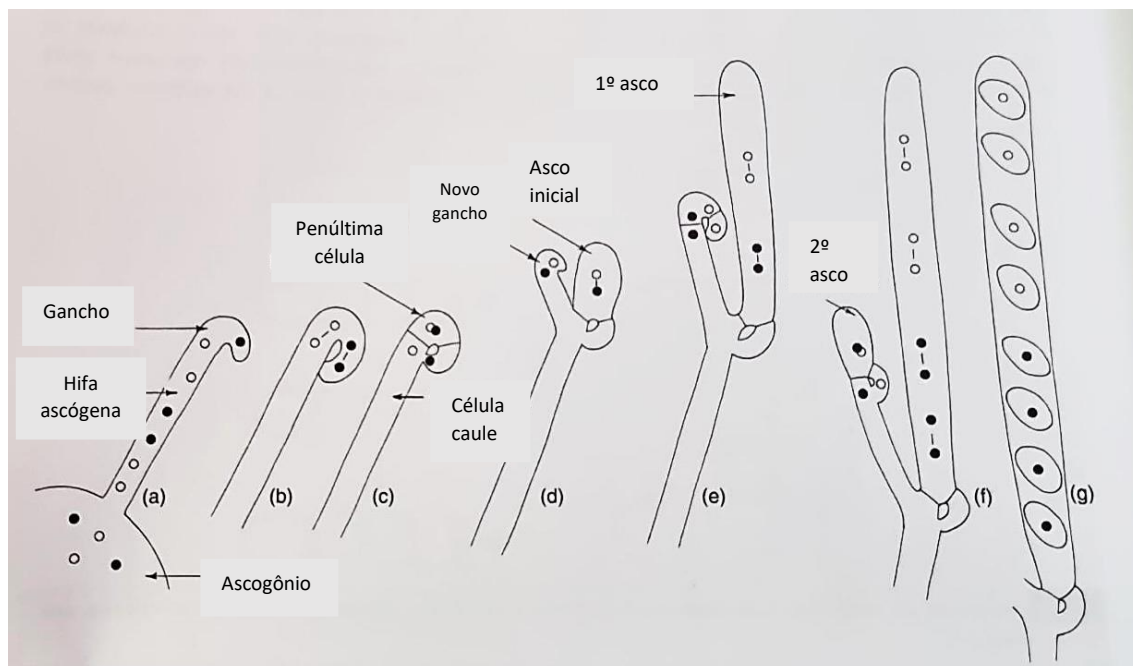
O processo sexual da fase teleomórfica de *Colletotrichum* é dividida em quatro etapas: iniciação do peritécio, plasmogamia, cariogamia e divisão meiótica reducional

(WHEELER, 1954). Vários processos seriam capazes de interferir nestas etapas. Formas heterotálicas poderiam surgir a partir do bloqueio de alguma destas etapas e este bloqueio poderia ser reparado através por meio de pareamento com outro isolado, ou seja, uma complementação poderia gerar uma compatibilidade sexual (WHEELER, 1996). Além disso, Wheeler (1954) propôs que linhagens heterotálicas se originariam de linhagens homotálicas por meio da quebra de blocos gênicos e/ou mutações.

Importante ressaltar que Barcelos et al. (2014) observaram que linhagens teleomórficas de *Colletotrichum* oriundas de lesões de antracnose no feijoeiro possuíam alta tendência a perda de fertilidade. Uma hipótese para este fenômeno seria a mutação em alguma das etapas descritas para autofertilidade. Os autores também observaram que a presença de compatibilidade sexual ocorria apenas quando o pareamento era realizado utilizando linhagem fértil. Esta complementação seria devido a substâncias oriundas das linhagens férteis (WHEELER, 1956). Além disso, existem estudos que indicam que hormônios específicos são capazes de induzir a autofertilidade (DRIVER; WHEELER, 1955; GARCIA-SERRANO, 2008; LIANG et al., 2021).

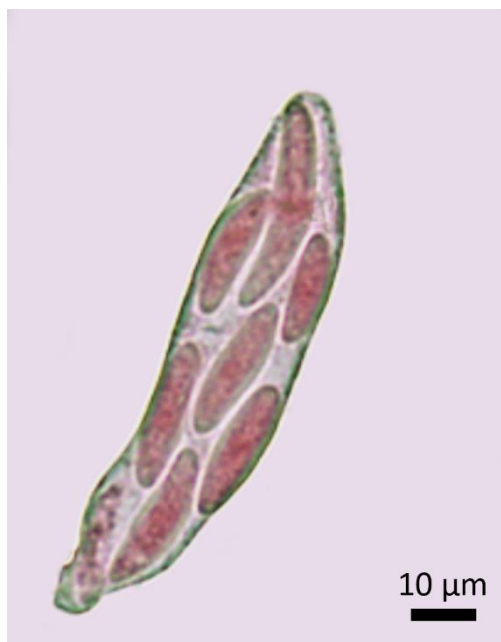
Na maioria dos Ascomicetos os ascos se desenvolvem a partir de uma hifa ascógena, a qual parte do Ascogônio (FIGURA 1A). Esta hifa é multinucleada e sua ponta é recurvada para formar um gancho (FIGURA 1B). Divisões nucleares conjugadas ocorrem simultaneamente com os dois núcleos no gancho (FIGURA 1C). Dois septos cortam a hifa de forma a separar a penúltima célula binucleada e estes núcleos se fundem e formam um núcleo diplóide. O segmento terminal uninuclear da hifa ascógena se curva e se funde com a hifa ascógena para formar a célula do caule (FIGURA 1D). A penúltima célula aumenta para dar início a um asco dentro do qual os núcleos de fusão começam a se dividir meioticamente. Um novo cruzamento é desenvolvido a partir da célula caule (FIGURA 1E). Uma segunda divisão meiótica ocorre no asco em desenvolvimento. O comportamento do novo gancho ocorre como o primeiro (FIGURA 1F). Divisão mitótica dos quatro núcleos haplóides resultantes da meiose no primeiro asco, formando os 8 ascósporos (FIGURA 1G e FIGURA 2). Os núcleos destes ascósporos podem sofrer novas mitoses e originar ascósporos binucleados ou multinucleados. Em *Taphrina* spp., os ascósporos podem sofrer brotamento dentro dos ascos, originando várias células leveduriformes, como veremos adiante (WEBSTER; WEBER, 2007).

Figura 1: Representação diagramática de características citológicas durante o desenvolvimento do asco em Ascomicetos.



Fonte: modificado de Webster & Weber (2007)

Figura 2: Asco de *C. lindemuthianum* com oito ascósporos expostos a Orceína 2%.



Fonte: Do autor (2022)

O esquema apresentado na Figura 1, generalizado para ascomicetos, também pode ser utilizado para *C. lindemuthianum*. No entanto, Roca, Davide e Mendes-Costa (2003)

realizaram uma análise citológica da meiose e mitose durante a formação de ascósporos de linhagens isoladas de plantas de feijoeiro. No final da prófase I, quatro cromossomos morfológicamente distintos – bivalentes - foram vistos e após a meiose havia núcleos em metáfase e anáfase em um único asco, indicando que a maturação dos ascósporos é assíncrona. Portanto, a formação dos ascósporos não é ordenada como o esquema padrão de ascomicetos, podendo haver variação no tempo de divisão, tamanho e ordenação no asco. Foram observados ascos que continham quatro ou seis ascósporos apenas, os quais eram oriundos de um processo de aneuploidia, sendo que o número padrão de cromossomos seria quatro (ROCA, DAVIDE & MENDES COSTA, 2003). Já para Gonçalves e Souza (2016), o número de cromossomos varia de cinco a 14 para *C. lindemuthianum* e de seis a 12 para a fase sexuada. e há polimorfismo cromossômico dentro de uma mesma linhagem.

A formação do peritécio propriamente dito é um processo concomitante ao desenvolvimento dos ascos e se dá a partir do crescimento e pigmentação de uma “manta hifálica” (LUCAS, 1946; WHEELER et al., 1948; McGAHEN; WHEELER, 1951; OLIVE, 1951; ESSER; KUEN, 1967).

2.3 Brotamento em fungos

O termo brotamento também é utilizado para a formação de esporos em *Saccharomyces cerevisiae* e em *Taphrina* spp., no entanto, em cada grupo existem particularidades intrínsecas que os diferem.

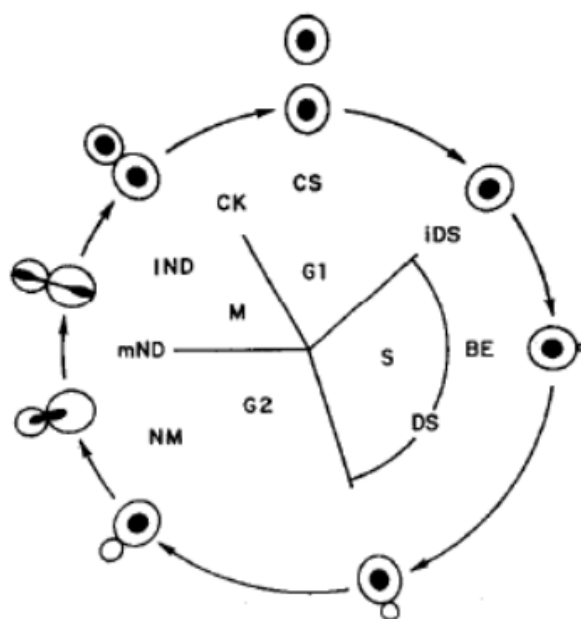
2.3.1 *Saccharomyces cerevisiae*

O brotamento é um fenômeno intensamente estudado em leveduras, as quais são fungos unicelulares ascomicetos ou basidiomicetos e cujo crescimento é oriundo principalmente de brotamento (KURTZMAN et al., 2011). A espécie mais estudada que se reproduz por brotamento é *Saccharomyces cerevisiae* (RUSSEL; NURSE, 1986)

Em *S.cerevisiae*, o brotamento é um processo mitótico e o broto aumenta de tamanho com o progresso do ciclo celular, podendo representar um indicador morfológico (HARTWELL et al., 1973; 1974), sendo que todas as células são capazes de sofrer brotamento. Uma sequência de eventos no ciclo celular tem sido proposta: iniciação de síntese de DNA (iDS); emergência do broto (BE); síntese de DNA (DS); migração nuclear (NM); divisão nuclear média (mND); divisão nuclear tardia (IND); citocinese (CK);

separação celular (CS). A fase G1 engloba o intervalo entre a citocinese anterior e a iniciação da síntese de DNA. A fase S é o período de síntese de DNA e nesta fase ocorre a emergência do broto. A fase G2 corresponde ao período entre a síntese de DNA e o início da mitose, a qual se inicia com a migração nuclear a termina com a citocinese (FIGURA 3) (HARTWEL, 1973; 1974).

Figura 3: Ciclo de divisão mitótica em Leveduras. Iniciação de síntese de DNA (iDS); emergência do broto (BE); síntese de DNA (DS); migração nuclear (NM); divisão nuclear média (mND); divisão nuclear tardia (IND); citocinese (CK); separação celular (CS); fases G1, S, G2 (Intérfase); mitose (M)



Fonte: Hartwell et al. (1973)

Em *S. cerevisiae* existem dois padrões espaciais quanto a posição do broto. O axial ocorre em células que apresentam apenas um dos alelos MAT (MAT α /MAT α), diploides ou haploides (HICKS et al., 1997). Este padrão é identificado pela formação de broto próximo ao local de divisão anterior - cicatriz do botão na mãe (FIGURA 4).

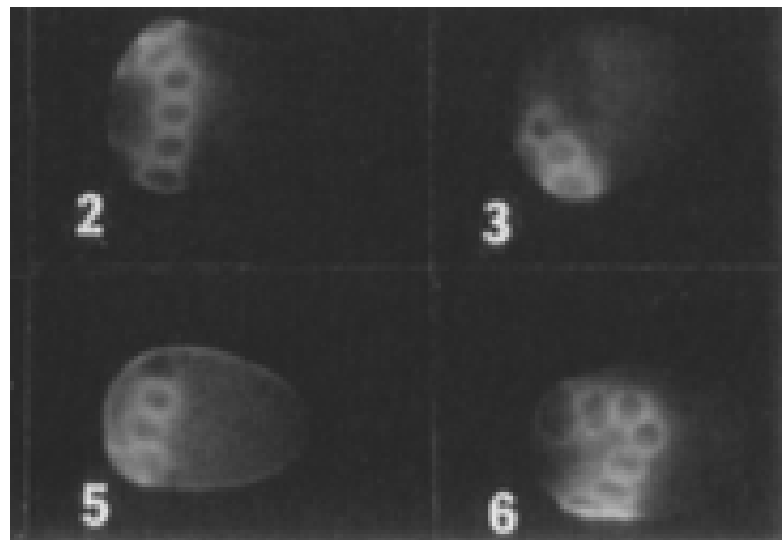
Figura 4: brotamento bipolar de células em *S.cerevisiae* por Microscópio de Fluorescência



Fonte: Chant & Pringle (1995)

Já o padrão bipolar é expresso em linhagens que possuem ambos os alelos mating type (CHANT; PRINGLE, 1991,1995), sendo que o novo broto pode surgir próximo ao local anterior ou no lado oposto (FIGURA 5).

Figura 5: Brotamento axial das células de *S.cerevisiae* por Microscópio de Fluorescência.



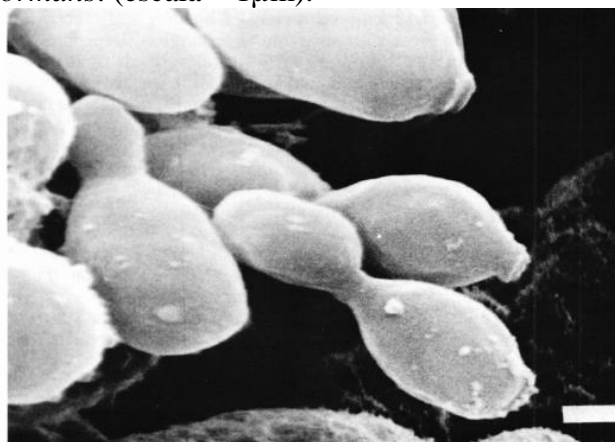
Fonte: Chant & Pringle (1995)

2.3.1 *Taphrina* spp.

O gênero *Taphrina* pertence à ordem Taphrinales e ao filo Ascomycota (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; KURTZMAN; SUGIYAMA, 2001). Todas as espécies do gênero são dimórficas (MIX, 1949; KRAMER, 1987; RODRÍGUES; FONSECA, 2003), sendo que os estados filamentosos são parasitas vasculares de plantas (MIX, 1949). A diferenciação de espécies do gênero se baseia na gama de hospedeiros e na distribuição geográfica, tipo, local de infecção e morfologia do estágio sexual no tecido infectado (MIX, 1949; RODRIGUES; FONSECA, 2003). No entanto, recentemente, caracterizações genéticas por meio de análises moleculares têm sido realizadas a fim de reavaliar os limites que definem as espécies (RODRIGUES; FONSECA, 2003). Uma das espécies mais bem elucidadas é o fungo *T. deformans*, o qual é biotrófico e causa ondulações nas folhas de pessegueiros (*Prunus persica*) (MIX, 1935; TAVARES et al., 2004).

Em *Taphrina* sp. ocorre um processo de multiplicação de ascósporos semelhante ao que ocorre em células de levedura, por este motivo também denominado de brotamento. O brotamento é um processo mitótico e tem início com a formação de uma saliência na região axial da célula mãe, sendo rara a sua formação na região lateral do ascósporo. De acordo com Vox Arx (1979;1981) o brotamento é considerado como holoblástico, multilateral ou acropetal (FIGURA 6).

Figura 6: Brotamento das células utilizando Microscópio Eletrônico de Varredura de *Taphrina deformans*. (escala = 1 μ m).



Fonte: Von Arx (1982)

Neste processo há formação de um conídio (blastósporo), mais ou menos oval e de menor dimensão que a “célula mãe”. Este processo pode ocorrer dentro e/ou fora dos ascos. Importante destacar que uma célula mãe origina um novo broto apenas quando o anterior já se destacou e não há formação de células em cadeia (UPADHYAY; PAVGI, 1973).

O brotamento em *T. deformans* é um fenômeno menos frequente em colônias mais antigas e por este motivo são geradas células com morfologias atípicas. Como exemplo, são formadas células com paredes grossas. Acredita-se que estas células poderiam conferir ao fungo uma maior capacidade de sobrevivência em ambientes desfavoráveis (FITZPATRICK, 1934).

No ciclo da doença, ascósporos que estão em folhas e frutos infectados, sofrem brotamento originando um conídio (FITZPATRICK, 1934; MIX, 1935; PSCHIEDT, 1995). Este conídio é capaz de penetrar no tecido do hospedeiro, sofrer cariogamia e posterior meiose, desenvolvendo ascos por meio da cutícula (AGRIOS, 2012). O conídio originado por brotamento pode seguir uma fase de levedura e sofrer novos brotamentos que originam conídios-brotos que hibernam em botões ou galhos (estilo saprófita) ou pode entrar em fase de micélio parasitário. O destino dos ascósporos do fungo que irá seguir o estilo saprófita até o momento em que há o estabelecimento da infecção no ano seguinte não é completamente compreendido (ROSSI & LANGUASCO, 2007). Nesta fase é possível crescer o fungo em meio de cultura (MIX, 1949; KRAMER, 1987). A fase de micélio parasitário ocorre quando em contato com folhas jovens e em condições climáticas favoráveis. A partir deste momento o tecido do hospedeiro é invadido e são desenvolvidos ascos como descritos anteriormente (MIX, 1935; AGRIOS, 2012).

Recentemente tem sido observado a presença de ascósporos originando outros via mitose em linhagens de *C. lindemuthianum*. Esse fenômeno foi aqui denominado como “brotamento”. Nestas linhagens também foi possível observar a presença de dimorfismo de ascósporos, classificados como alantoides ou amendoados de acordo com sua morfologia. Estes ascósporos podem sofrer brotamento e originar ascósporos amendoados ou alantoides. Ainda não há a descrição do brotamento em ascósporos no gênero *Colletotrichum*, já que este é um fenômeno que até momento não havia sido observado. Portanto, o objetivo desse trabalho é estudar e caracterizar o fenômeno aqui descrito como brotamento em ascósporos e verificar a possível presença deste fenômeno *in vivo* em plantas crescidas em casa de vegetação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem da linhagem

Foi utilizada uma linhagem homotática de *C. lindemuthianum*, UFLA84-1, oriunda de lesões de antracnose. A linhagem é proveniente da micoteca do Laboratório de Resistência de Plantas a Doenças da UFLA. A linhagem foi previamente caracterizada por Pinto et al (2012) e Pereira (2019) quanto aos caracteres fisiológicos, citológicos, morfológicos e filogenéticos. A linhagem foi isolada de uma planta de feijoeiro comum (*Phaseolus vulgaris* L.) da cultivar Majestoso e quando inoculada também gerou sintomas de antracnose.

3.2 Idade da colônia e porcentagem de brotamento

Para determinação do tempo ideal de incubação e posterior caracterização do brotamento, um disco de micélio foi transferido para uma placa de Petri contendo meio BDA. Essa placa foi incubada em BOD por 35 dias e 14 avaliações foram realizadas durante esse período, sendo que o primeiro dia de avaliação foi aos 22 dias e o último aos 35 dias. Em cada dia foram obtidas três amostras da placa por meio da retirada de peritécios, os quais foram esmagados e depositados em lâminas estéreis com água estéril. O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente ao acaso com três repetições, sendo avaliadas 14 tempos de incubação, isto é, a idade da colônia. Foi avaliada a porcentagem de brotamento em cada tempo de avaliação.

3.3 Análise do processo do brotamento

Para a obtenção de peritécios, discos de micélio da linhagem foram transferidos para cinco placas de Petri contendo meio de cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD à 23 °C. Após 28 dias foram adicionados 6 mL de água estéril nas placas e estas foram raspadas a fim de desprender os peritécios do meio de cultura e das vagens. Estes peritécios foram esmagados em placas de Petri e a suspensão filtrada usando uma membrana Miracloth estéril. Posteriormente, foram adicionados 10 µL da suspensão na Câmara de Neubauer e a concentração ajustada para $1,2 \times 10^6$ esporos mL⁻¹.

Foram depositadas 9,0 µL de suspensão de esporos e 2,5 µL de Iodeto de Propídio (1,0 mg/ml diluído em água, excitação 493 nm e emissão 636 nm) em lâminas e lamínulas

esterilizadas para visualização do núcleo e estas foram incubadas por 10 minutos no escuro. Foi utilizado o microscópio invertido Zeiss Axiovision Observer Z1 em objetiva de 40x e as imagens processadas no programa Zen 2011 (Zeiss, Germany). A partir das imagens obtidas também foi avaliado o padrão de formação e a posição do broto no ápice, na lateral ou em ambas as posições.

Além disso, também foram utilizadas análises com microscópio eletrônico de varredura de ultra resolução (FEG -Tescan-Clara, Czech Republic) no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural da Universidade Federal de Lavras (LME- UFLA). Este microscópio explora técnicas de microscopia eletrônica de varredura por fonte de emissão de campo através de um feixe de elétrons nas condições de 10 elétron-volt (KeV), 90 Pascal (pA) com distância de trabalho de 10mm.

A suspensão de esporos foi obtida como descrito anteriormente e foi fixada utilizando solução Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M pH 7,5 e CaCl₂ 0,01M) (BOSSOLA & RUSSELL, 1998; ALVES et al., 2013). Posteriormente, gotas de suspensão de esporos foram posicionadas sobre a fita de carbono de dupla face, aderindo ao porta-amostras denominado de *stubs*. Após um período de overnight em sílica em gel para secagem, a amostra foi metalizada com ouro em aparelho *sputtering* (Balzers SCD 050) (BOSSOLA & RUSSELL, 1998; ALVES et al., 2013)

3.4 Análise citológica de ascósporos e porcentagem de brotamento

Discos de micélio da linhagem foram transferidos para três placas de Petri contendo meio de cultura BDA acidificado (200 µL de ácido lático a 85% por litro de meio) (RODRÍGUEZ-GUERRA et. al, 2005). Para a obtenção da suspensão de esporos foi utilizada a metodologia descrita no item 3.2.

As lâminas foram preparadas de acordo com a metodologia proposta por Schwarzacher, Heslop e Harrjson (2000). As lâminas foram mergulhadas em acetona por 15 minutos e secas a 180 °C por 2 horas. Após esfriar, uma gota de solução de poly-L-lysine, 0,1% (Sigma P8920) previamente diluída em água destilada (1:10) será adicionada sobre a lâmina. Utilizando uma lamínula tratada com Ácido Clorídrico (HCL) 6N, a solução poly-L-lysine foi espalhada sobre a superfície da lâmina em uma área demarcada através de movimentos constantes. As lâminas foram secas durante a noite a 37 °C e armazenadas em temperatura ambiente. As medições citológicas foram obtidas utilizando o microscópio invertido Zeiss Vert A1.

Uma pequena alíquota das suspensões de ascósporos obtidas foi destinada a confecção das lâminas. A dimensão dos ascósporos foi obtida por meio da mensuração do comprimento e da largura de 20 ascósporos alantoides e 20 amendoados. Também foram medidos ascósporos durante o processo de brotamento. Posteriormente, foi obtida uma média para cada tipo de ascósporo. Para a porcentagem de brotamento foi quantificado o número de ascósporos que estão envolvidos no processo em uma amostra de 100 ascósporos. O experimento foi conduzido em Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com três repetições sendo cada parcela constituída por cinco lâminas.

3.5 Análise do “brotamento” *in vivo*

Para a análise do brotamento *in vivo* foram realizados dois experimentos. Um experimento conduzido em casa de vegetação e outro experimento conduzido em BOD. Foram utilizadas duas cultivares de feijoeiro comum, Pérola e BRSMGMajestoso.

No experimento conduzido em casa de vegetação foram semeadas três sementes de cada cultivar por vaso de cinco litros contendo o substrato comercial Tropstrato® HA. As plântulas no estágio V2 (folhas primárias completamente expandidas) foram inoculadas de acordo com a metodologia descrita por Martins et al. (2019). Para a obtenção da suspensão de esporos, a linhagem do fungo foi cultivada em placas de Petri e incubadas em BOD à 23 °C. Após 22 dias foram adicionados 6 mL de água estéril nas placas e estas foram raspadas a fim de destacar os peritécios do meio. Estes foram depositados em placas de Petri contendo água deionizada e amassados. Posteriormente, foi realizada uma filtragem usando uma membrana Miracloth estéril. Foram adicionados 10 µL da suspensão na Câmara de Neubauer e a concentração ajustada para $1,2 \times 10^6$ esporos mL⁻¹. A inoculação foi realizada nas nervuras das folhas e no hipocótilo com o auxílio de uma seringa até a saturação do tecido. Os vasos foram mantidos em câmara de nebulização por 48 horas com temperatura 23 °C e umidade de 80 %. Posteriormente, os vasos foram transferidos para casa de vegetação com temperatura 23 °C e umidade de 75 %.

No segundo experimento foi realizada a semeadura da cultivar em bandejas de poliestireno com substrato comercial Tropstrato® HA e mantidas em casa de vegetação. Posteriormente, foram destacados folhas e hipocótilos das plantas no estágio V2, os quais foram inoculados em laboratório com a suspensão de esporos obtida como descrito acima. Foram utilizados cortes de hipocótilo de três centímetros de comprimento. Os tecidos inoculados foram armazenados em placas de Petri estéreis contendo papel filtro

previamente esterilizado e levemente umedecido com água estéril. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura de 23 °C em BOD por 31 dias. As avaliações foram realizadas aos 15, 20, 25, 28 e 31 dias.

Os peritécios foram retirados dos tecidos, depositados em Placas de Petri e amassados utilizando água estéril. A suspensão de esporos obtida foi gotejada em lâminas de vidro e observada a presença/ausência de “brotamento” utilizando microscópio de luz (Nikon®, Eclipse E200, Japão).

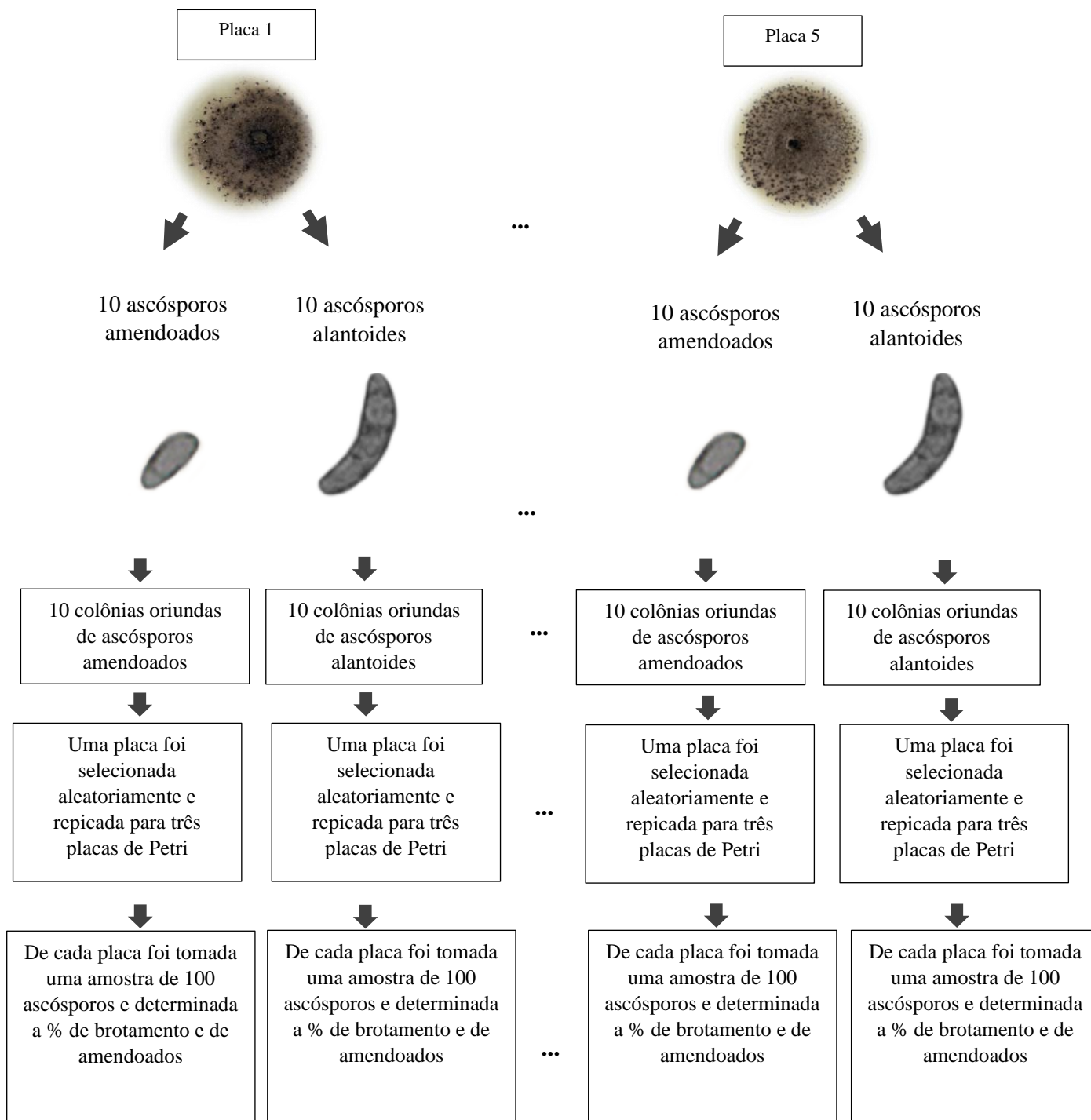
3.6 Tipo de colônia oriunda de ascósporos alantoides e amendoados

A linhagem foi cultivada em placas de Petri e incubadas em BOD à 23 °C. Aos 28 dias de crescimento, a linhagem foi repicada para cinco placas contendo meio BDA acidificado. Estas placas permaneceram em BOD a 23 °C por 28 dias. A partir das colônias formadas em cada placa, foram tomados dez ascósporos alantoides e dez amendoados que foram transferidos para placas de Petri. As colônias obtidas foram avaliadas quanto à cor da colônia e tipo de colônia de acordo com Chilton & Wheeler (1949): Conidial A - não periteciais que apresentam produção de conídios em massas de conídios; Conidial B - não periteciais que produzem conídios esparsos; Plus - periteciais com produção de peritécios em grumos; Minus - são linhagens periteciais com produção de peritécios espalhados (FIGURA 7).

3.7 Porcentagem de brotamento e de ascósporos amendoados

Para a avaliação da porcentagem de brotamento foram utilizadas cinco colônias aleatórias obtidas de ascósporos alantoides e cinco amendoados como descrito no item 3.6. De cada colônia uma amostra de 100 ascósporos foi avaliada quanto à formação de brotamento e número de ascósporos amendoados. O delineamento foi inteiramente ao acaso com dois tratamentos (alantoides e amendoados) e cinco repetições. A parcela foi constituída por uma amostra de 100 ascósporos (FIGURA 7).

Figura 7: Esquema para classificação morfológica das placas oriundas de ascósporos amendoados e alantoides e posterior obtenção de porcentagem de brotamento e de ascósporos amendoados.



Fonte: Do autor (2022)

3.7 Análise estatística

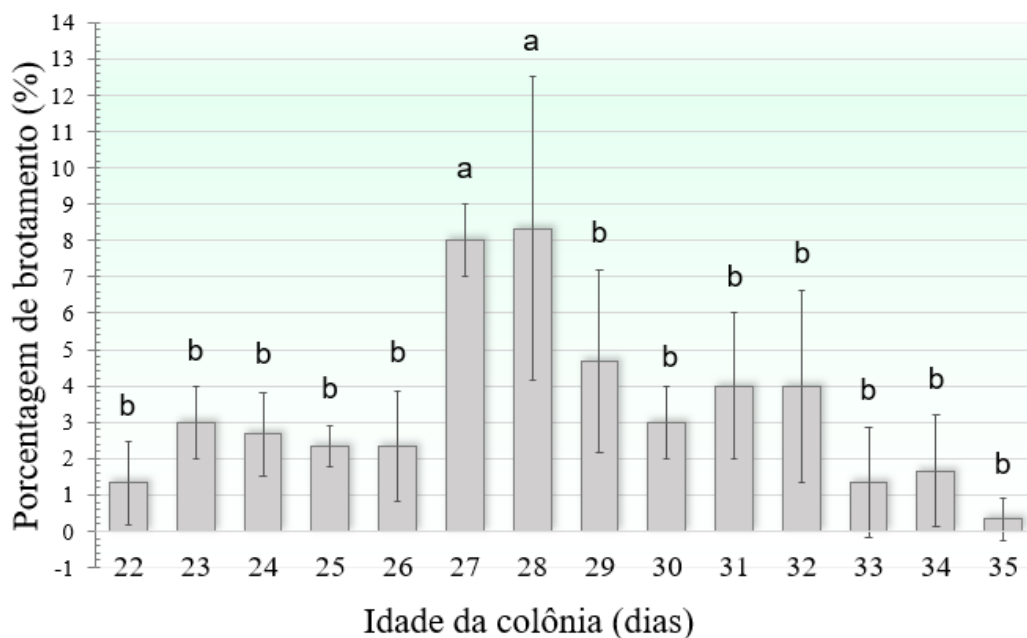
Os dados de dimensão de ascósporos e porcentagem de brotamento foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de agrupamento de Scott Knott (1974), ao nível de 5% de probabilidade, por meio do software GENES (CRUZ, 2013).

4 RESULTADOS

4.1 Idade da colônia e porcentagem de brotamento

Foi observada diferença significativa ($P=0,004$) para a porcentagem de brotamento nas diferentes idades da colônia. Maior porcentagem de brotamento ocorreu aos 27 e 28 dias de incubação, sendo que não houve diferença significativa entre estes dois dias pelo teste de Scott Knott ($P=0,05$) (FIGURA 8). Portanto, as culturas foram mantidas em BOD por 28 dias.

Figura 8: Porcentagem média de brotamento da linhagem UFLA84-1 de *C. lindemuthianum* entre 22 e 35 dias de incubação.



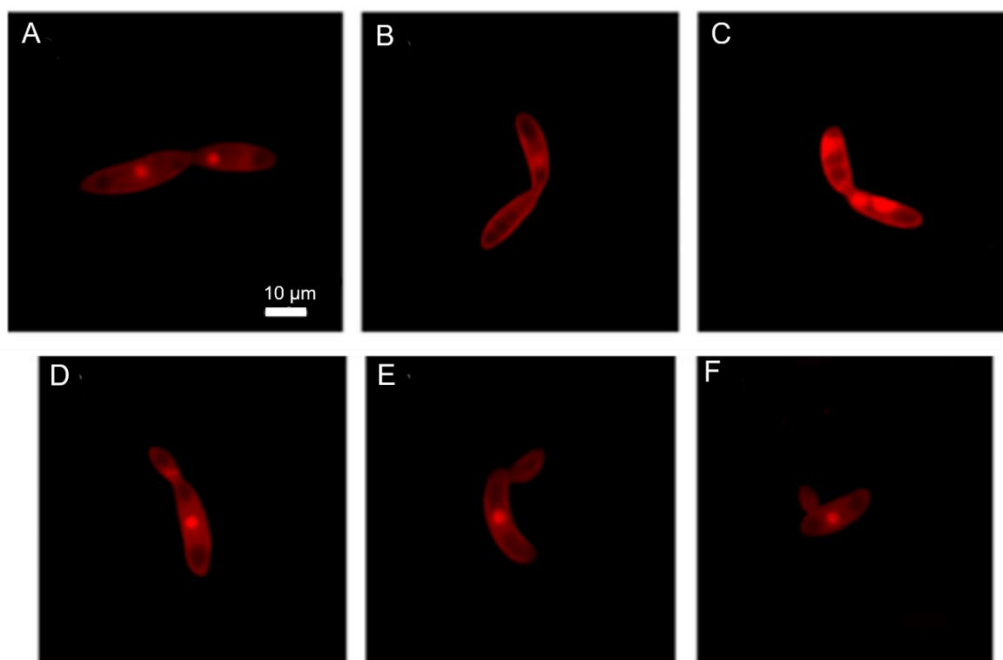
Fonte: Do autor (2022)

4.2 Análise do processo do brotamento

O corante Iodeto de Propídio (IP), capaz de corar núcleos, permitiu a visualização do brotamento, e que esse fenômeno é capaz de gerar ascósporos nucleados e com núcleos concentrados e arredondados (FIGURA 9A). Entretanto, existem aqueles que aparentam estar no mesmo estágio, mas apenas um núcleo está corado (FIGURA 9B). Também foi observada a presença de núcleos com dimensões maiores e/ou com duas regiões coradas no mesmo ascósporo (FIGURA 9C). Existem ainda ascósporos que se apresentam totalmente corados (FIGURA 9D). Portanto, sugere-se que estes ascósporos estejam em diferentes fases do ciclo mitótico.

No estágio inicial do processo, não é possível observar o núcleo no ascósporo em formação na grande maioria dos casos, sendo que em alguns é possível notar a presença de uma estrutura mais clara no novo ascósporo (FIGURA 9D). Quanto ao padrão de brotamento, observou-se que este pode ocorrer de forma apical (FIGURA 9A, 9B, 9C e 9D) ou lateral (FIGURA 9E e 9F). Inclusive ascósporos com menores dimensões podem sofrer brotamento (FIGURA 9F).

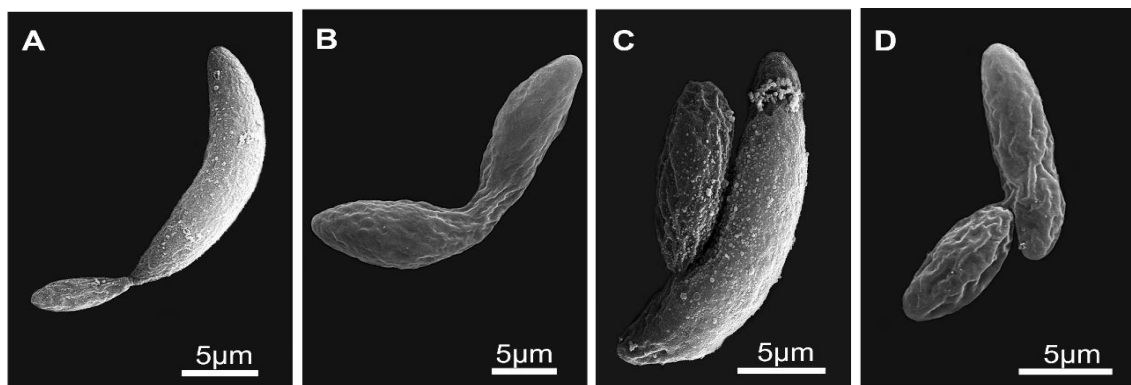
Figura 9: Ascósporos de *C. lindemuthianum* em brotamento, submetidos ao corante Iodeto de Propídio e visualizados no Microscópio de Fluorescência.



Fonte: Do autor (2022)

As imagens obtidas pelo FEG também mostram estes diferentes padrões de brotamento (FIGURA 10). É possível observar o estágio inicial e final do brotamento que ocorre apicalmente (FIGURA 10A e 10B) e o estágio final do brotamento lateral (FIGURA 10C e 10D).

Figura 10: Ascósporos de *C. lindemuthianum* em brotamento visualizados no Microscópio de Varredura de Ultra Resolução (FEG).



Fonte: Do autor (2022)

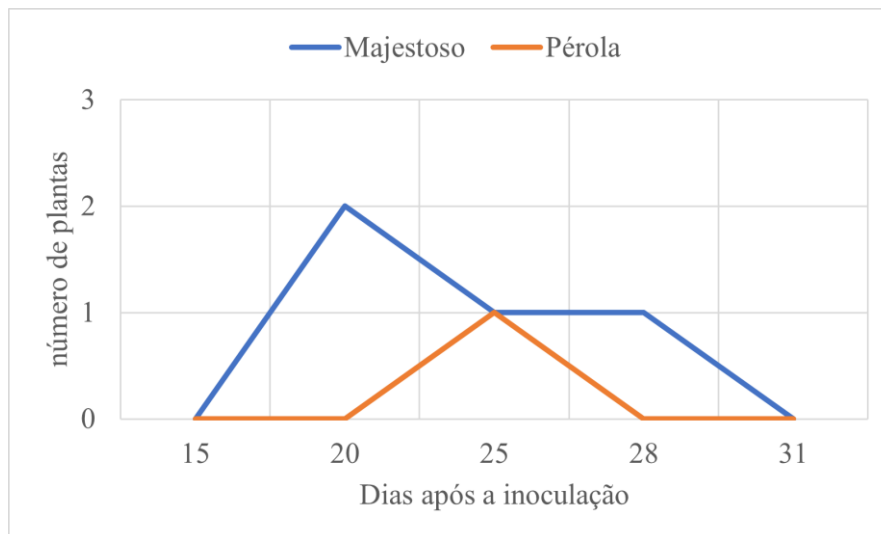
4.3 Análise citológica de ascósporos e porcentagem de brotamento

Foi observada diferença significativa ($P < 0,01$) para o comprimento dos ascósporos. Os ascósporos alantoides mediram em média $25,34 \mu\text{m}$ de comprimento, variando de $24,35$ a $27,23 \mu\text{m}$. A largura média foi de $6,39 \mu\text{m}$, variando de $6,04$ e $7,09 \mu\text{m}$. Já os ascósporos amendoados apresentaram $15,60 \mu\text{m}$ de comprimento, variando de $12,33$ a $19,67 \mu\text{m}$. A largura média foi de $6,51 \mu\text{m}$, variando de $5,42$ a $7,63 \mu\text{m}$. A porcentagem média de brotamento foi de 3,20 ascósporos. Além disso, ascósporos alantoides e amendoados de diversas dimensões são capazes de gerar outro, via mitose. O comprimento médio foi de $16,14 \mu\text{m}$, variando de $11,43 \mu\text{m}$ até $20,06 \mu\text{m}$.

4.4 Análise do “brotamento” *in vivo*

No experimento conduzido em BOD, foram encontrados brotamentos nas folhas e caules de duas plantas da cultivar BRSMGMajestoso aos 20 dias após inoculação. Aos 25 dias foram observados brotamentos nas duas cultivares. Já aos 28 dias, encontrou-se brotamento apenas na cultivar BRSMGMajestoso. Não foram encontrados brotamentos aos 31 dias após a inoculação. Nas plantas mantidas em casa de vegetação, não foram encontrados ascósporos em brotamento até os 33 dias após inoculação (GRÁFICO 1).

Gráfico 1: Gráfico do número de plantas com brotamento nas cultivares Majestoso e Pérola.

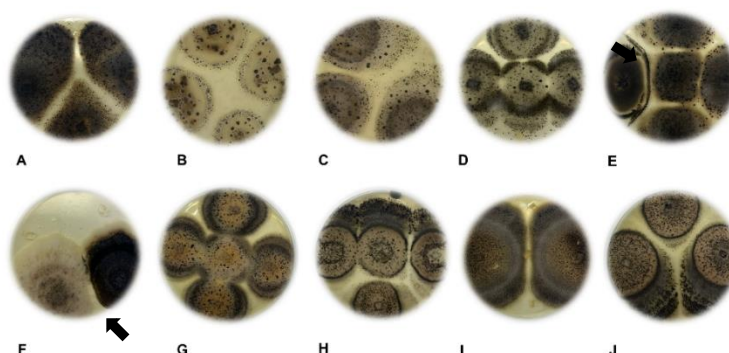


Fonte: Do autor (2022)

4.5 Tipo de colônia oriunda de ascósporos alantoides e amendoados

Observou-se que há uma ampla variabilidade quanto as características morfológicas das colônias, como pode-se observar na Figura 11, Tabela 1 e Apêndice A. Os dois tipos de ascósporos podem gerar colônias de distintas colorações e de tipos de colônia de acordo com a classificação de Chilton & Wheeler (1949).

Figura 11: Morfologia das colônias (periteciais e conidiais) de isolados monoascóspóricos oriundos de ascósporos amendoados (A, C, E, G, I) e alantoides (B, D, F, H, J) de *C. lindemuthianum*. Setas indicam colônias conidiais.



Fonte: do Autor (2022)

Tabela 1: Caracterização morfológica (número e cor das colônias e tipo de colônia) de isolados monoascospóricos de ascósporos alantoides e ameadoados de *C. lindemuthianum* obtidos a partir de cinco colônias.

Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5
Colônias oriundas de ascósporos alantoides				
5 colônias marrons ^{PM}	3 colônias marrons ^{PP}	2 colônias marrons ^{PM}	3 colônias brancas com extremidade preta ^{PP}	7 colônias cinzas ^{PM}
4 colônias cinzas ^{PM}	4 colônias cinzas em tom mais escuro ^{PP}	5 colônias cinzas ^{PM}	1 colônia branca ^{PM}	1 colônia alaranjada ^{PM}
1 colônia branca ^{PP}	1 colônia branca ^{PP}	2 colônias brancas ^{PM}	5 colônias marrons ^{PP}	2 colônias alaranjadas e pretas nas bordas ^{PP}
-	2 colônias brancas ^{PM}	1 colônia preta ^{CB}	1 colônia marrom ^{PP}	-
Colônias oriundas de ascósporos ameadoados				
4 colônias marrons ^{PM}	2 colônias marrons e alaranjada no centro ^{PM}	9 colônias marrons ^{PM}	1 colônia preta ^{CB}	2 colônias alaranjadas e acinzentadas nas bordas ^{PM}
2 colônias brancas e acinzentadas ^{PP}	1 colônia marrom ^{PP}	1 colônia preta ^{CB}	1 colônia cinza ^{PP}	1 colônia cinza ^{PM}
4 colônias brancas ^{PP}	5 colônias marrons ^{PM}	-	2 colônias marrons ^{PP}	2 colônias cinzas com extremidade preta ^{PP}
-	3 colônias brancas acinzentadas no centro ^{PP}	-	4 colônias alaranjadas ^{PM}	1 colônia Cinza ^{PM}
-	-	-	1 colônia branca ^{PM}	2 colônias marrons ^{PM}
-	-	-	-	1 colônia branca ^{PP}
-	-	-	-	1 colônia branca ^{PP}

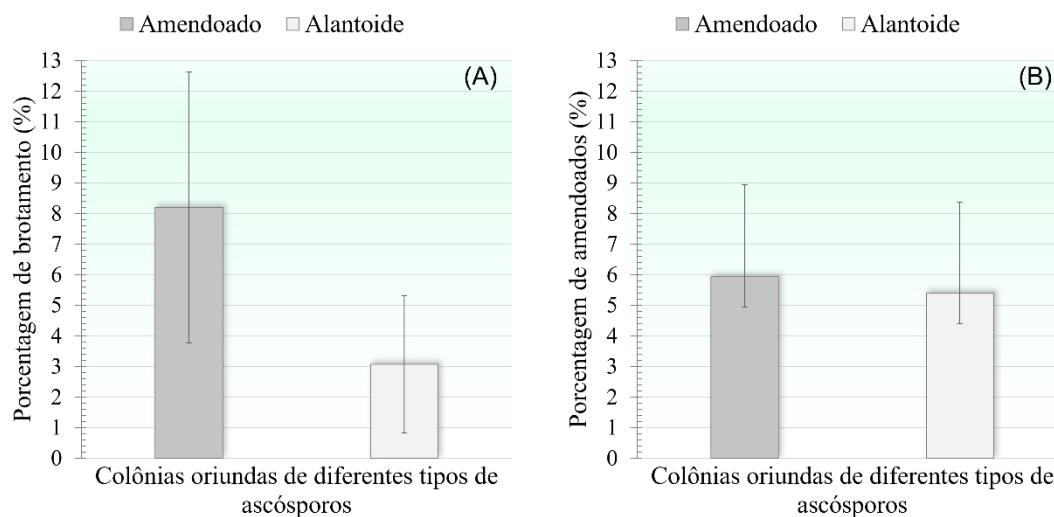
Legenda: PM: Peritecial Minus; PP: Peritecial Plus; CB: Conidial B

Fonte: do Autor (2022)

4.6 Porcentagem de brotamento e de ascósporos amendoados

Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) para a porcentagem de brotamento entre as colônias oriundas de ascósporos alantoides e amendoados, indicando que colônias oriundas do último produzem uma maior taxa de brotamento. Quanto a porcentagem de amendoados, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Há uma mesma quantidade de ascósporos amendoados em ambas as colônias, sendo que os alantoides estão em maior proporção (FIGURA 12).

Figura 12: Porcentagem de brotamento de ascósporos em colônias monoascóspóricas obtidas por ascósporos amendoados e alantoides de *C. lindemuthianum* (A) e porcentagem de ascósporos amendoados nas mesmas colônias obtidas (B)



Fonte: Do autor (2022)

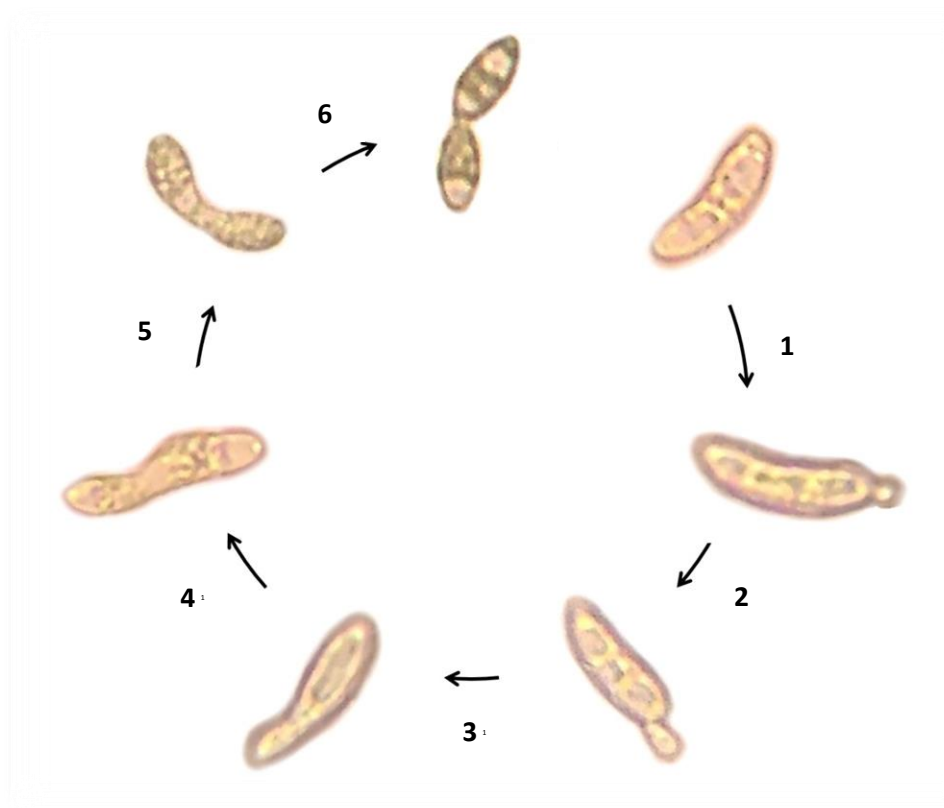
5 DISCUSSÃO

A partir das imagens obtidas da fase sexual da linhagem UFLA84-1 de *C. lindemuthianum* com microscopia de luz, fluorescência e de varredura de alta resolução (FEG) foi possível descrever o brotamento, isto é, o processo no qual um ascósporo de morfologia amendoada ou alantoide origina outro ascósporo via mitose. Este é o primeiro relato sobre a ocorrência de brotamento de ascósporos no gênero *Colletotrichum*. O ascósporo oriundo deste processo pode ser amendoado ou alantoide (este último é mais raro) e é formado apicalmente ou lateralmente (FIGURA 9 e 10). Posteriormente, estes ascósporos podem originar novos ascósporos por brotamento. Para facilitar o entendimento, o ciclo foi dividido em seis estádios, sendo que o processo todo, se desenvolve após a liberação de todos os ascósporos de um asco. (FIGURA 13).

No estágio 1 é visualizada uma saliência que representa a emergência do broto (FIGURA 13). No estágio 2 o broto se desenvolve, há aumento de tamanho e ele é facilmente visualizado. Na figura 6G, obtida por microscopia de fluorescência, pode ser observado um ascósporo amendoado neste estágio de brotamento, onde ainda não há visualização de núcleo no broto. No estágio 3, o broto já apresenta maior comprimento como pode ser visto nas figuras 9D e 10A. Na imagem obtida por fluorescência já é possível visualizar o núcleo em formação no broto. No entanto, nas imagens obtidas pela microscopia de luz e de fluorescência não foi possível visualizar o momento de divisão do núcleo. O estágio 4 se refere ao momento em que o novo ascósporo já possui dimensões próximas a sua dimensão final. Neste estágio as duas células encontram-se intimamente ligadas, não havendo evidência de citocinese. Já no estágio 5, as duas células apresentam tamanho semelhante, no entanto, ainda permanecem fortemente unidas, como pode ser observado nas FIGURAS 9A e 10B. Houve tentativas de separação das duas células por meio de micromanipulação, centrifugação e maceração em almofariz, sem sucesso, comprovando a forte ligação entre elas. No estágio 6, o novo ascósporo já está maduro e pronto para ser liberado. As duas células ainda estão conectadas, mas existe uma constrição na região central, sendo a região de ocorrência da citocinese (FIGURA 9C, 10C e D). Foram realizadas várias tentativas para visualizar o momento de rompimento e liberação dos dois ascósporos resultantes do processo de brotamento. Ademais, nas colônias foram observados conídios que são esporos assexuais formados

por reprodução assexuada. Portanto, o processo de brotamento gera novos ascósporos que são os esporos sexuais.

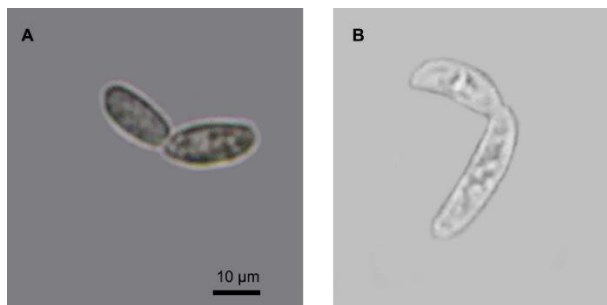
Figura 13: Ciclo do brotamento em ascósporos de *C. lindemuthianum*.



Fonte: Do autor (2022)

Como dito anteriormente, há a possibilidade de formação de ascósporos com diferentes morfologias (FIGURA 14). Foram observados ascósporos amendoados produzindo outros amendoados, bem como, ascósporos alantoides produzindo ascósporos amendoados. Também foi observado que ascósporos alantoides originam outros de mesma morfologia. No entanto, foi observado que este fenômeno é raro.

Figura 14: Ascósporo amendoado (A) e alantoide (B) de *C. lindemuthianum* originando ascósporos amendoados por brotamento



Fonte: Do autor (2022)

Vale destacar que o brotamento é um fenômeno intensamente estudado em leveduras, as quais são fungos unicelulares ascomicetos ou basidiomicetos e cujo crescimento é oriundo principalmente de brotamento (KURTZMAN et al., 2011). A espécie mais estudada que se reproduz por brotamento é *Saccharomyces cerevisiae* (RUSSEL; NURSE, 1986). Existem vários estudos com análises moleculares dos genes envolvidos em todo o processo de brotamento nesta espécie (HARTWELL et al., 1973, 1974, 1971; NURSE, 1975; YU et al., 2006; PERRINO, 2021; FISCHER, 2021). O processo descrito acima difere em alguns aspectos do processo de brotamento em *S. cerevisiae* e *Taphrina* spp. Não foi observada a ocorrência de brotamento dentro dos ascos, como ocorre em *Taphrina* spp (UPADHYAY; PAVGI, 1973). No entanto, essa possibilidade não é descartada, apenas não foi observada neste estudo. Além disso, em *Taphrina* spp. o brotamento dá origem a conídios e não ascósporos (UPADHYAY; PAVGI, 1973), como ocorre em *C. lindemuthianum*. Outro ponto, é que em levedura o processo de brotamento ocorre na reprodução assexual, diferente do que foi relatado neste estudo.

As dimensões de ascósporos alantoides foram semelhantes às relatadas por Castro et al. (2006) e Barcelos et al. (2014). Castro et al. (2006) também encontraram ascósporos anões de dimensões similares às encontradas para os ascósporos amendoados. Estes autores relataram a presença de dimorfismo de ascósporos a partir da observação de um setor formado em uma colônia de *C. lindemuthianum*, sendo que neste setor foram observados ascósporos anões. Porém, na linhagem UFLA84-1 utilizada no presente trabalho, os ascósporos amendoados ocorrem naturalmente, bem como os ascósporos alantoides. Portanto, essa linhagem apresenta dimorfismo de ascósporos. Martins et al.

(2019) também encontraram ascósporos amendoados utilizando uma linhagem de *C. karstii*, isolada do feijoeiro.

Na caracterização morfológica quanto a cor e o tipo de colônia foram observados colônias de diferentes cores, tanto periteciais, como conidiais. No entanto, observou-se maior frequência de colônias periteciais (TABELA 1, FIGURA 11). A ocorrência de colônias conidiais e periteciais evidencia a ocorrência de mudança de colônias plus para minus como relatado na literatura (LIANG et al. 2021) Houve variabilidade para a coloração das colônias periteciais independente da classificação plus ou minus.

Liang et al.(2021) propuseram um modelo para *C. fruticola*, uma espécie com sistema de acasalamento sexual atípico apresentando mudança de Plus para Minus e o fenômeno de aprimoramento sexual mediado por Plus e Minus na linha de contato. Foi observado que a linhagem Minus comporta-se como o parceiro feminino e produz peritécios de forma abundante, podendo fertilizar linhagens deambos os tipos. A mudança de Plus para Minus facilita, portanto, a reprodução sexual (fertilização cruzada e autofecundação). A linhagem tipo Minus quando se autofertiliza exibe pouca eficiência na maturação, ou seja, produz poucos ascósporos. No entanto, por meio da fertilização cruzada e por sinais liberados na zona de contato, essa condição pode ser alterada.

No presente trabalho, nos experimentos conduzidos *in vivo*, foi observada a presença de brotamento em folhas e pecíolos destacados mantidos em BOD. No entanto, não foi observado o brotamento em casa de vegetação. Uma provável explicação é a temperatura mais elevada em casa de vegetação. A temperatura pode afetar o processo de brotamento, como observado em *Saccharomyces* (HARTWEL, 1973). No entanto, Martins et al. (2019) observaram a presença de peritécios e ascósporos em abundância em folhas e pecíolos de plantas senescentes e úmidas mantidas em casa de vegetação.

A reprodução sexuada é um mecanismo de recombinação genética e é responsável pela ampliação da variabilidade genética e o processo de brotamento aumenta o número de ascósporos gerados pela meiose. Portanto, o brotamento pode representar uma vantagem adaptativa do patógeno, pois há a multiplicação de esporos de origem sexual - ascósporos- em menor tempo por meio de mitose. Considerando uma população do patógeno e 1 milhão de ascósporos, por exemplo, haveria uma grande quantidade de brotamento e, portanto, aumentando significativamente na quantidade de ascósporos. Novos estudos devem ser realizados para elucidar detalhadamente o processo aqui descrito como brotamento.

6 CONCLUSÕES

- O processo de brotamento em ascósporos de *C. lindemuthianum* ocorre após a sua liberação dos ascos. Diferentes estádios de desenvolvimento foram observados a partir da emergência do broto até a formação do novo ascósporo por meio de mitose;
- A ocorrência de dimorfismo de ascósporos foi observada na linhagem UFLA84-1 de *C. lindemuthianum*;
- A porcentagem de brotamento é maior em colônias de ascósporos amendoados.

REFERÊNCIAS

- AGRIOS, G.N. **Plant Pathology**. Edition 3, 845 p., 2012.
- ALEXOPOULOS, C. J.; MIMS, C. W.; BLACKWELL, M. Introductory **Mycology**, 4th edn. New York: John Wiley, 1996.
- ALVES E. et al. 2013. Scanning Electron Microscopy for fungal Sample Examination. In: Gupta VK et al. (eds.) Laboratory Protocols in Fungal Biology: **Current Methods in Fungal Biology, Fungal Biology**, DOI 10.1007/978-1-4614-2356-0_8. Springer Science.
- AZEVEDO, J. L. Recombinação em fungos filamentosos. In: COSTA, S. O. P. (Ed.). **Genética molecular e de microrganismos**. p. 393-407, 1987.
- AZEVEDO, J. L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 2, n. 1, p. 3-15, 1976.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. 388 p. 1992.
- BARCELOS, Q. L. et al. Characterization of *Glomerella* strains recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- BARCELOS, Q. L.; PINTO, J. M.; VAILLANCOURT, L. J.; SOUZA, E. A. Characterization of *Glomerella* strains recovered from anthracnose lesions on common bean plants in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 3, p. e90910, 2014.
- BARCELOS, Q.L.; SOUZA, E. A.; VAILLANCOURT, I. Morphological and phylogenetic analysis of *Glomerella* and *C. lindemuthianum* strains isolated from common bean anthracnose lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**. Palo Alto, v. 54, n. 1, p. 224-225, 2011.
- BATISTA, U. G.; CHAVES, G. M. Patogenicidade de culturas monoascospóricas de cruzamento entre raças de *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magn.) Scrib. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 7 n. 2, p. 285-293, 1982.
- BOZZOLA J.J.; RUSSEL D.L. **Electron Microscopy** 2nd Ed. Boston: Jones and Barlett Publishers. 670p, 1998.
- BRYSON, R. J. Sexual hybridization and the genetics of pathogenic specificity in *Colletotrichum lindemuthianum*. 1980. University of Birmingham, Birmingham, 1980.
- CAMARGO-JÚNIOR, O. C. et al. A. Identification of *Glomerella cingulata f.sp phaseoli* recombinants by RAPD markers. **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n. 3, p. 607-615, 2007.
- CAPELLE, J.; NEEMA, C. Local adaptation and population structure at a micro-geographical scale of a fungal parasite on its host plant. *Journal of Evolutionary Biology*. 18, p. 1445-1454, 2005.

- CASTRO, R.A.; MENDES-COSTA, M.C.; SOUZA, E.A Dimorfismo de ascósporos em *Glomerella cingulata* f.sp.*phaseoli*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 31, p. 598-600, 2006.
- CHANT, J.; J. R. PRINGLE. Budding and cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 1, n. 3, p. 342-350, 1991.
- CHANT, J.; PRINGLE, J.R. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of Cell Biology**, v. 129, 1995.
- CHILTON, S. J. P.; WHEELER, H. E. Genetics of *Glomerella*. VI. Linkage. **American Journal of Botany**, Columbus, v. 36, n. 3, p. 270-273, 1949.
- COPPIN, E. et al. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 4, p. 411–428, 1997.
- COPPIN, E.; DEBUCHY R.; ARANEISE S.; PICARD. Mating types and sexual development in filamentous ascomycetes. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 61, p. 411–428, 1997.
- CRUZ, C.D. GENES - a software package for analysis in experimental statistics and quantitative genetics. **Acta Scientiarum**. v. 35, n. 3, p. 271-276, 2013.
- DA SILVA, L.L et al. *Colletotrichum*: species complexes, lifestyle, and peculiarities of some sources of genetic variability. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-14, 2020.
- DAMM, U. et al. The *Colletotrichum dracaenophilum*, *C. magnum* and *C. orchidearum* species complexes. **Studies in Micology**, v. 92, p. 1–46, 2019.
- DEAN, R. A et al. (eds.), **Genomics of Plant-Associated Fungi: Monocot Pathogens**, 2014.
- DEBUCHY R.; BERTEAUX-LECELLIER V., SILAR P. Mating systems and sexual morphogenesis in ascomycetes. **Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi**, edited by Borkovich K. A., Ebbole D. J. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p. 501-535, 2010.
- DIAS, M. A.; MOTA, S. F.; COSTA, L. C.; SOUZA, E. A. Characterization of *Colletotrichum* spp. strains from common bean anthracnose and scab lesions. **Annual Report of the Bean Improvement Cooperative**, v. 60, p. 7-8, 2017.
- DRIVER C.H.; WHEELER, H.E. A sexual hormone in *Glomerella*. **Mycologia** v. 47, p. 311–316, 1955.
- EDGERTON, C.W. Plus and minus in an Ascomycete. **Science**, v. 35, p. 151, 1912.

EDGERTON, C.W. Plus and minus in the genus *Glomerella*. **American Journal of Botany**, v. 1, p. 244-254, 1914.

ESSER, K.; R, KUENEN. Genetics of fungi. IX+500 pp. New York, **Springer-Verlag**, 1967.

FISCHER, G.; LITI, G; LLORENTE, B. The budding yeast life cycle: More complex than anticipated?. **Yeast**, v. 38, n. 1, p. 5-11, 2021.

FITZPATRICK, R.E. The life history and parasitism of *Taphrina deformans*. **Scientific Agriculture**, v. 14, p. 305–326, 1934.

GAN, P. et al. Comparative genomic and transcriptomic analyses reveal the hemibiotrophic stage shift of *Colletotrichum* fungi. **New Phytologist**, v. 197, n. 4, p. 1236–1249, 2013.

GARCÍA-SERRANO, M. et al. Analysis of the MAT1-2-1 gene of *Colletotrichum lindemuthianum*. **Mycoscience**, v. 49, n. 5, p. 312-317, 2008.

GONÇALVES, P.R.C.; SOUZA, E. Cariotipagem de çinhagens de *Colletotrichum lindemuthianum* e *Glomerella* spp; isoladas de lesões de antracnose do feijoeiro Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantase - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

HARTWELL, L. H. et al. Genetic control of the cell division cycle in yeast: A model to account for the order of cell cycle events is deduced from the phenotypes of yeast mutants. **Science**, v. 183, n. 4120, p. 46-51, 1974.

HARTWELL, L. H. Genetic control of the cell division cycle in yeast: II. Genes controlling DNA replication and its initiation. **Journal of Molecular Biology**, v. 59, n. 1, p. 183-194, 1971.

HARTWELL, L.H.; MORTIMER R. K.; CULOTTI, J.; CULOTTI, M. Genetic control of the cell division cycle in yeast. **Genetics**, v. 74, n. 2, p. 267-286, 1973.

HERSKOWITZ, I. Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiological Reviews**, v. 52, n. 4. p. 536-553, 1988.

HICKS, J. B.; STRATHERN, J.N; HERSKOWITZ, I. Interconversion of yeast mating types. III. Action of the homothallism (HO) gene in cells homozygous for the mating type locus. **Genetics**, v. 85, n. 3, p. 395-405, 1997.

ISHIKAWA, F. H. et al. Live-cell imaging of conidial fusion in the bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*. **Fungal Biology**, Cambridge, v. 114, n. 1, p. 2–9, 2010a.

ISHIKAWA, F. H. et al. Symptoms and Prepenetration Events Associated with the Infection of Common Bean by the Anamorph and Teleomorph of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. **Journal of Phytopathology**, v. 158, p. 270-277, 2010b.

JAYAWARDENA R. S. et al. Notes on currently accepted species of *Colletotrichum*. **Mycosphere**, v. 7, n. 8, p. 1192–1260, 2016.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. Agronômica Ceres São Paulo, v.2, 690 p, 1997.

KIMATI, H.; GALLI, F. *Glomevella cingulata* (Stonem.) Spauld. Et v. Scherenk. f. sp. *phaseoli* n. f., fase ascógena do agente causal da antracnose do feijoeiro. **Anais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, Piracicaba, n. 27, p. 411-437, 1970.

KRAMER, C. L. The Taphrinales. In *The Expanding Realm of Yeast-like Fungi*. Edited by G. S. de Hoog, M. Th. Smith & A. C. J. Weijman. Amsterdam: **Elsevier**. 151–166, 1987.

KURTZMAN, C. P. & SUGIYAMA, J. Ascomycetous yeasts and yeast-like taxa. In *The Mycota*. Edited by D. J. McLaughlin, E. G. McLaughlin & P. A. Lemke. Berlin: **Springer**. vol. VIIA, pp. 179–200, 2001.

KURTZMAN, C. P. A new methanol assimilating yeast, *Ogataea parapolyomorpha*, the ascosporic state of *Candida parapolyomorpha*. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 3, p. 455-462, 2011.

LIANG, X. et al. Molecular dissection of perithecial mating line development in *Colletotrichum fructicola*, a species with a nontypical mating system featuring plus-to-minus switch and plus-minus-mediated sexual enhancement. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 87, n. 12, p. e00474-21, 2021.

LUCAS, G.B. Genetics of *Glomerella*. Nuclear phenomena in the ascus, **American Journal of Botany**, v. 33, p. 802-806, 1946.

MARIN-FELIX, Y. et al. Genera of phytopathogenic fungi. **Studies in Micology**, v. 86, p. 99–216, 2017.

MARTINS, A. C. F.; DIAS, M. A; PEREIRA, F. A. C.; SOUZA, E. A. Production *in vitro* and *in vivo* of sexual structures of *Glomerella* spp. strains from common bean. **Annual Report of Bean Improvement Cooperative**, v. 62, p. 15-16, 2019.

McGAHEN, J.W; WHEELER, H.E., Genetics of *Glomerella*.IX. Perithecial development and plasmogamy. **American Journal of Botany**,. v. 38, p. 610-617, 1951.

MENDES-COSTA, M. C. Genetics of *Glomerella cingulata* f.sp. *phaseoli*. sexual compatibility. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 19, n. 230, p. 350, 1996.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos do gênero *Colletotrichum* Teleomorfo: *Glomerella*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica**, Recife, v. 3, n. 1, p. 170-179, Aug. 2006.

- MIX, A. J. A monograph of the genus *Taphrina*. **Univ Kans Sci Bull** 33, 3–167, 1949.
- MIX, A.J. The life history of *Taphrina deformans*. **Phytopathology** 25: 41–66, 1935.
- MOTA, S. F. et al. Variability of *Colletotrichum* spp in common bean. **Genetics and Molecular Research**, v. 15, n. 2, 2016.
- NI, M et al. Sex in fungi. **Annual Review of Genetics**. v. 45, p. 405–430, 2011.
- NURSE, P. Genetic control of cell size at cell division in yeast. **Nature**, v. 256, n. 5518, p. 547-551, 1975.
- O'CONNELL, R. J et al. Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. **Nature Genetics**, v. 44, p. 1060–1065, 2012.
- OLIVE, L. S. Homothallism and heterothallism in *Glomerella*. **Academy of Sciences**, v. 13, p. 238-242, 1951.
- PAULA JÚNIOR, T. J. de; WENDLAND, A. (Ed.). **Melhoramento genético do feijoeiro-comum e prevenção de doenças**. Viçosa, MG: Epamig.p.157, 2021.
- PEREIRA, L. F. Análise filogenética de isolados de *Colletotrichum* associados à sarna e à antracnose do feijoeiro. 2019. 55 p. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) –Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2019.
- PERRINO, G et al. Automatic synchronisation of the cell cycle in budding yeast through closed-loop feedback control. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.
- PINTO, J. M. A.; PEREIRA, R.; MOTA, S. F.; ISHIKAWA, F. H.; SOUZA, E. A. Investigating phenotypic variability in *Colletotrichum lindemuthianum* populations. **Phytopathology**, v. 102, p. 490-497, 2012.
- PSCHEIDT, J.W. **Leaf Curl**. In: Ogawa JM, Zehr EI, Bird GW, Ritchie DF, Uriu K and Uyemoto JK (eds) Compendium of Stone Fruit Diseases (pp 19–20) APS Press, St. Paul., USA, 1995.
- RAVA, C. A.; SARTORATO, A. Principais doenças do feijoeiro comum e seu controle. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Brasília, p 17-40, 1994.
- ROCA, M. G.; DAVIDE, L.C.; MENDES-COSTA, M. C. Cytogenetics of *Colletotrichum lindemuthianum* (*Glomerella cingulata* f. sp. *phaseoli*). **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, p. 367-373, 2003.
- RODRIGUES, M.G; FONSECA, A. Molecular systematics of the dimorphic ascomycete genus *Taphrina*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 53, p. 607–616, 2003.

- RODRÍGUEZ-GUERRA, R. et al. Heterothallic mating observed between Mexican isolates of *Glomerella lindemuthiana*. **Mycologia**, v. 97, n. 4, p. 793-803, 2005.
- ROSSI, V.; LANGUASCO, L. Influence of environmental conditions on spore production and budding in *Taphrina deformans*, the causal agent of peach leaf curl. **Phytopathology**, v. 97, n. 3, p. 359-365, 2007.
- RUSSELL, P.; P, NURSE. 1986. *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*: a look at yeasts divided. **Cell**, v. 45, n. 6, p. 781-782, 1986.
- SCHWARZACHER, T., AND HESLOP-HARRISON, J.S. (2000). Practical in situ Hybridization. (Oxford, UK: Bios).
- SCOTT, A. J.; KNOTT, M. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, Arlington, v. 30, n. 3, p. 507-512, 1974.
- SHEAR, C. L.; WOOD, A. K. Studies of fungus parasites belonging to the genus *Glomerella*. **Bureau of Plant Industry**, n. 252, p. 110, 1913.
- SOUZA, B.; SOUZA, E. A.; MENDES-COSTA, M. C. Determinação da variabilidade em isolados de *Colletotrichum lindemuthianum* por meio de marcadores morfológicos e culturais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 4, p. 1000-1006, 2007.
- SOUZA, E. A.; CAMARGO-JÚNIOR, O. A.; PINTO, J. M. A. Sexual recombination in *Colletotrichum lindemuthianum* occurs on a fine scale. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, n. 3, p. 1759-1769, 2010.
- SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: BAILEY, J. A.; JEGGER, M. J. (Ed.). **Colletotrichum: biology, pathology and control**. Wallingford, p. 1-26, 1992.
- TAVARES et al. Direct detection of *Taphrina deformans* on peach trees using molecular methods. **European Journal of Plant Pathology**, v. 110, p. 973-982, 2004.
- UPADHYAY, R.; PAVGI, M. S. Morphology, development and cytology of *Taphrina maculans* butler. **Mycopathologia et Mycologia applicata**, v. 50, n. 2, p. 109-126, 1973.
- VAILLANCOURT, L. J.; WANG, J.; HANAU, R. Genetic regulation of sexual compatibility in *Glomerella graminicola*. In: PRUSKY, D.; REEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host-pathogen interaction**, p. 29-44, 2000.
- VON ARX, J. A. Propagation in the yeasts and yeast-like fungi. In: **The whole fungus**. Ed. B. Kendrick. Natl. Museums of Canada, Ottawa, p. 555-571, 1979.
- VON ARX, J. A. The genera of fungi sporulating in pure culture. J. Cramer, Vaduz. 424 p., and A. C. M. Weijman. 1979. Conidiation and carbohydrate composition in some

Candida and *Torulopsis* species. **Antonie van Leeuwenhoek, Ned. Tijdschr. Hyg.** v.45, p. 547-555, 1981.

VON ARX, J.A.; VAN DER, J. P.;LIEBENBERG. V. D. M. G The classification of *Taphrina* and other fungi with yeast-like cultural states, **Mycologia**, v. 74, n. 2, p. 285-296, 1982.

WEBSTER, J.; WEBER, R. W. S. Introduction to fungi Third edition Cambridge University Press. **Cambridge, UK**, 2007.

WHEELER, H. E et al. Genetics of *Glomerella*. V.Crozier and ascus development. **American Journal of Botany**, v. 35, p. 722-729, 1948.

WHEELER, H.E et al. Genetics and evolution of heterothallism in *Glomerella*. **Phytopathology**, v. 44, p. 342-345, 1954.

WHEELER, H.E. Linkage groups in *Glomerella*. **American Journal of Botany** v. 43, p. 1–6, 1956.

WILKEN, P.M. et al. DNA loss at the *Ceratocystis fimbriata* mating locus results in self- sterility. **PLoS one**, v. 9, n. 3, p. e92180, 2014.

XU, L.; JARDINI, T.; CHEN, W. Direct repeat-mediated DNA deletion of the mating type MAT1-2 genes results in unidirectional mating type switching in *Sclerotinia trifoliorum*. **Scientific Reports**, v. 6, p. 27083, 2016.

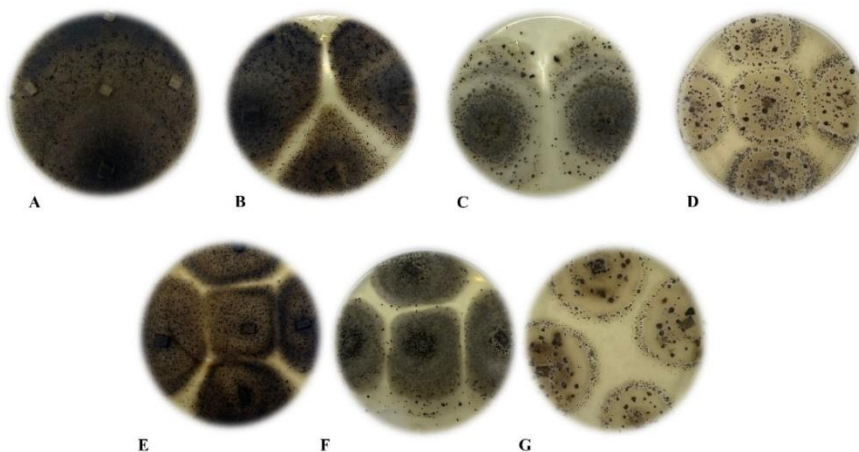
YU, L. et al. A survey of essential gene function in the yeast cell division cycle. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, p. 4736-4747, 2006.

YUN et al. Self-fertility in *Chromocrea spinulosa* is a consequence of direct repeat-mediated loss of MAT1-2, subsequent imbalance of nuclei differing in mating type, and recognition between unlike nuclei in a common cytoplasm. **PLoS genetics**, v. 13, 2017.

YUN, S. H. et al. Evolution of the fungal self-fertile reproductive life tyle from self-sterile ancestors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p. 5592–5597, 1999.

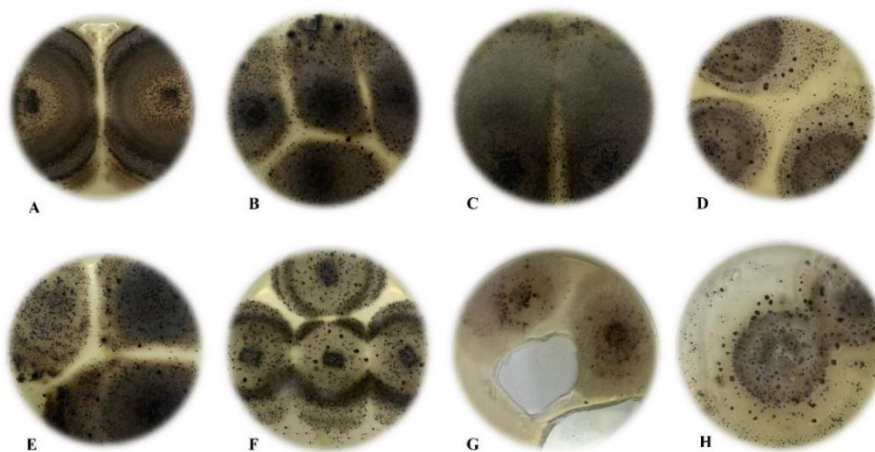
APÊNDICE A

Figura 1: monoascospóricas de ascósporos amendoados (A – D) e ascósporos alantoides (E-G) oriundos da placa um



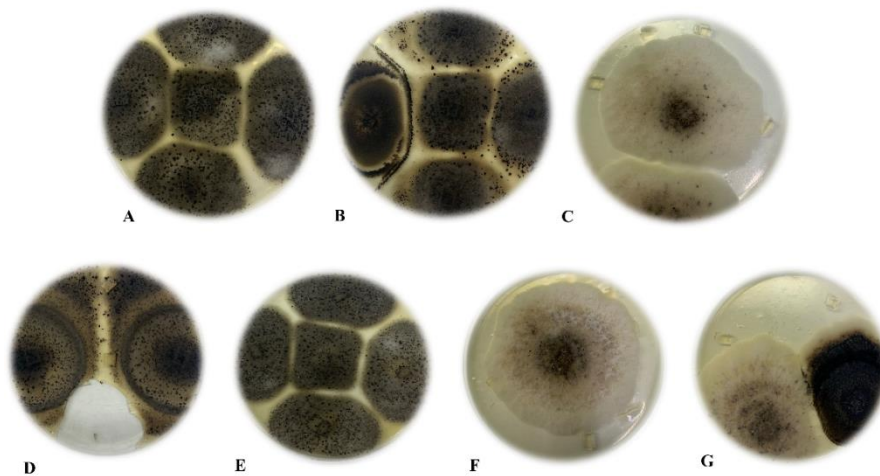
Fonte: Do autor (2022)

Figura 2: monoascospóricas de ascósporos amendoados (A-D) e ascósporos alantoides (E-H) de *C. lindemuthinaum* oriundos da placa dois.



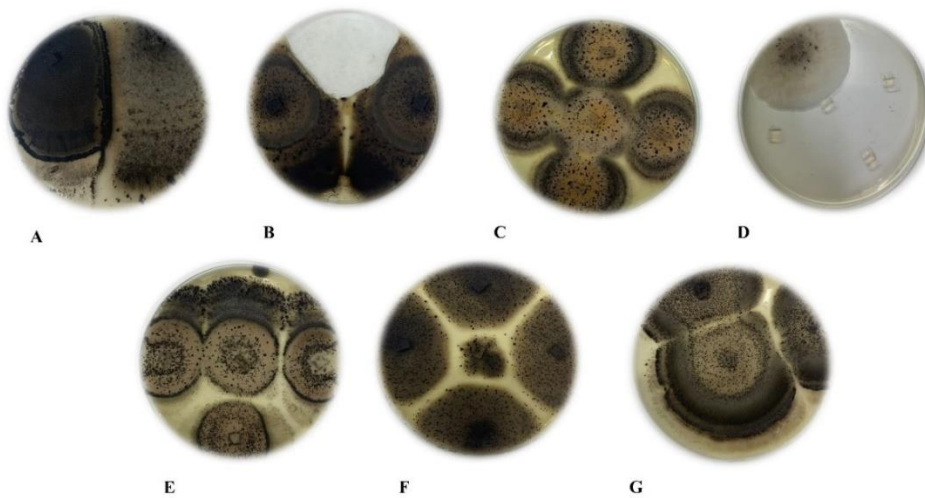
Fonte: Do autor 2022

Figura 3: monoascospóricas de ascósporos amendoados (A-C) e ascósporos alantoides (D-G) de *C. lindemuthinaum* oriundos da placa três.



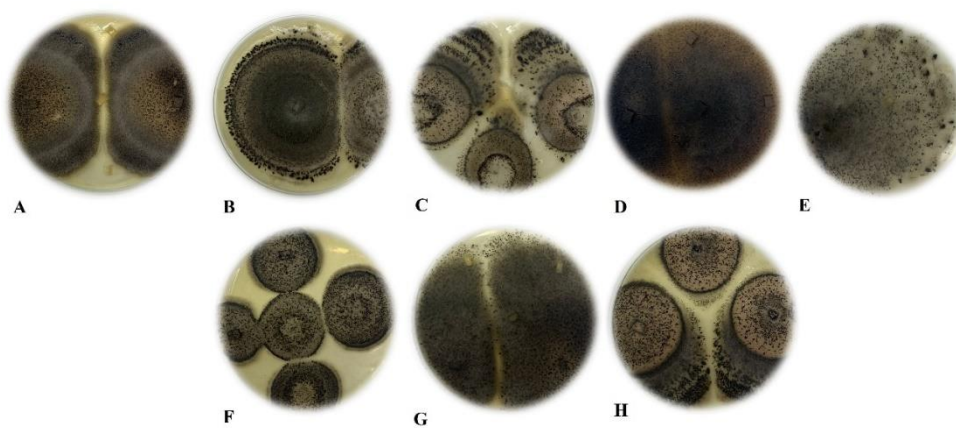
Fonte: Do autor (2022)

Figura 4: monoascospóricas de ascósporos amendoados (A-D) e ascósporos alantoides (F-G) de *C. lindemuthinaum* oriundos da placa quatro.



Fonte: Do autor (2022)

Figura 5: monoascospóricas de ascósporos amendoados (A-E) e ascósporos alantoides (F-H) de *C. lindemuthinaum* oriundos da placa cinco.



Fonte: Do autor (2022)