

1<sup>a</sup> Reunião da  
Sociedade Portuguesa de Fitopatologia

A Fitopatologia Portuguesa  
num Contexto de Mudança

*Resumos alargados*

Vila Real

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro  
3 e 4 de Outubro de 1996

REUNIÃO DA SOCIEDADE PORTUGUESA DE FITOPATOLOGIA, 1ª, Vila Real, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 3 e 4 de Outubro de 1996. 1ª Reunião da Sociedade portuguesa de fitopatologia: a fitopatologia portuguesa num contexto de mudança: resumos alargados/Sociedade Portuguesa de Fitopatologia. — Vila Real: Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 1996. — [Extra-Série] (9), V, 226 p.: il.; 30 cm  
Contém índice  
ISBN: 972-669-235-0 DL: 103764/96

1. Fitopatologia - - [Congressos]

CDU: 581.2  
061.3

<i>Editor:</i>		Sector Editorial dos SDE
<i>Impressão e acabamento</i>		Serviços Gráficos da UTAD
		Apartado 206
Tiragem: 250 exemplares		5001 Vila Real-Portugal-Codex

SISTEMAS SEXUAIS EM ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE *Albugo candida*

Jorge, L. e Dias, J.S.

Instituto Superior de Agronomia, Tapada da Ajuda, 1300 Lisboa

## RESUMO

Apresenta-se a primeira caracterização sexual de isolamentos portugueses de *A. candida*. Foram examinados treze isolamentos de campo e isolamentos de pústula única (IPU) deles derivados, 5 de *B. oleracea*, 7 de *B. rapa* e um de *Raphanus sativus*. Alguns dos isolamentos de campo e IPU deles derivados apresentam produções de oósporos diferentes. A maioria dos IPU estudados são auto-estéreis (heterotáticos) excepto os Ac501 (Belinho, Esposende) e Ac502 (Lourinhã, Lourinhã) que foram considerados homotáticos secundários porque: i) apresentaram um pequeno número de oósporos (1 a 5) por cotilédone; e ii) por se comportarem como heterotáticos quando combinados com outros isolamentos provenientes de hospedeiros homólogos.

Os IPU de *B. rapa* estudados pertencem todos a um mesmo grupo de emparelhamento ("mating type"). Nos IPU de *B. oleracea* foram observados dois grupos de compatibilidade sexual: i) com Ac501 (Belinho, Esposende), Ac502 (Lourinhã, Lourinhã) e Ac504 (Santa Cruz, Torres Vedras); e ii) com Ac503 (Costa de Caparica) e Ac505 (Albogas, Loures).

## ABSTRACT

The present study presents the first sexual characterization of Portuguese isolates of *A. candida*. Thirteen field isolates and single pustules (SP) derivatives, 5 from *B. oleracea*, 7 from *B. rapa* and one from *Raphanus sativus* were examined. Some field isolates and SP derivatives presented different production of oospores.

The majority of the SP isolates studied are self-sterile (heterothallic) except Ac501 (Belinho, Esposende) and Ac502 (Lourinhã, Lourinhã) that were considered secondary homothallic because: i) they presented few number of oospores (1 to 5) by cotyledone; and ii) they have a heterothallic behaviour when combined with isolates from homologous hosts.

The SP isolates of *B. rapa* studied were all from the same mating type. In *B. oleracea* isolates two mating types were observed: i) with Ac501 (Belinho, Esposende), Ac 502 (Lourinhã, Lourinhã) and Ac504 (Santa Cruz, Torres Vedras); and ii) with Ac 503 (Costa de Caparica, Almada) and Ac505 (Albogas, Pero Pinheiro).

**Key words:** White rust, white blister, matting types.

## INTRODUÇÃO

*Albugo candida* (Pers.) Kuntze, o agente causal da ferrugem das crucíferas, é um fungo biotrófico da ordem *Peronosporales* e classe Oomicetas que ataca as folhas, caules e inflorescências de muitas crucíferas. Esta classe de organismos é diploide com meiose nos gametângios. A fertilização ocorre pela passagem de um único núcleo haploide de um anterídio para a oosfera onde ele se funde com o núcleo do ovo do oogónio, donde resulta a formação do zigoto, o oósporo (Webster, 1980).

Na natureza, a reprodução sexual da *A. candida* ocorre em caules e inflorescências hipertrofiados e nas folhas senescentes de plantas infectadas. Os oósporos são a forma em que o patogénio assegura a sua sobrevivência em condições ambientais desfavoráveis. Apesar da

importância dos oósporos como fonte de inóculo primário e de variação genética, o sistema sexual de *A. candida* é ainda bastante desconhecido. Existem apenas evidências circunstanciais de que isolamentos de *A. candida* da bolsa-do-pastor (*Capsella bursa-pastoris*) são heterotálicos (auto-estéreis) com a reprodução sexual estimulada pela infecção secundária pelo míldio das crucíferas, *Peronospora parasitica* (Sansome & Sansome, 1974). Naquela e noutras crucíferas não existem quaisquer estudos de determinação do sistema sexual de isolamentos patogénicos de *A. candida*. Estudos detalhados do sistema sexual foram, contudo, feitos noutros membros das *Peronosporales*.

Tanto o homotalismo (auto-fertilidade) como o heterotalismo foram demonstrados em espécies de *Phytophthora* (Savage *et al.*, 1968), e em vários míldios, como por exemplo, o *P. parasitica* (Sheriff & Lucas, 1989 a,b) e o *Bremia lactucae* (Michelmore & Ingram, 1980, 1982). Recentemente Sequeira & Monteiro (1996) caracterizaram o sistema sexual de isolamentos portugueses de *P. parasitica*.

O presente trabalho apresenta a primeira caracterização sexual de treze isolamentos portugueses de *A. candida*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamentos e obtenção de isolamentos de pústula única

No presente estudo foram examinados 13 isolamentos de *A. candida* provenientes de inóculos colhidos em diferentes crucíferas cultivadas (5 de *Brassica oleracea*, 7 de *B. rapa* e 1 *Raphanus sativus*; *cf.* Quadro 1). Aqueles isolamentos foram todos colhidos no campo e deles obtiveram-se isolamentos de pústula única (IPU) através de inoculações com concentrações de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  zoósporos/ml.

Com estas concentrações procurou-se assegurar o desenvolvimento de pústulas únicas, produzidas por zoósporos uninucleados individuais, em cada cotilédone. Os IPU obtidos foram depois cultivados individualmente, durante 3 gerações, em cotilédones de hospedeiros homólogos utilizando uma única pústula para iniciar cada geração. Os isolamentos derivados da terceira geração foram então cultivados durante mais duas gerações para se obterem zoosporangios suficientes para determinação dos sistemas sexuais. Na metodologia de inoculação e incubação seguiram-se de perto as técnicas descritas em Santos *et al.* (1996).

## Determinação dos sistemas sexuais

A metodologia utilizada para a caracterização dos sistemas sexuais encontra-se descrita com detalhe em Jorge (1996). Os hospedeiros homólogos susceptíveis escolhidos para a inoculação com as combinações de isolamentos foram: i) a couve tronchuda Murciana para os cruzamentos entre isolamentos de *B. oleracea*; e ii) o nabo Globo de 60 dias para todas as combinações de isolamentos de *B. rapa*. O IPU Ac513 de rábano não foi sujeito a cruzamento por não existirem outros isolamentos de *R. sativus* disponíveis.

Para cada cruzamento, entre inóculos de hospedeiros homólogos, a suspensão final para inoculação com uma concentração de  $1 \times 10^5$  zoósporos/ml foi obtida pela junção de iguais volumes de suspensões iniciais de igual concentração de cada um dos isolamentos em estudo. Em cada cruzamento inocularam-se 30 plantas (60 cotilédones) com duas gotas de 10  $\mu$ l por cotilédone.

Foram colhidos e preparados para observação ao microscópio cotilédones de todos os isolamentos iniciais, dos IPU deles derivados e dos cruzamentos efectuados. A colheita dos cotilédones foi feita, em média, 17 a 18 dias após a inoculação numa fase de senescência dos cotilédones. Na preparação dos cotilédones para posterior observação ao microscópio e detecção dos oósporos adaptou-se a metodologia de Sherriff & Lucas (1989b).

Nos cotilédones de *B. oleracea* mais espessos recorreu-se ainda à imersão numa solução de hidrato cloral durante 7 dias. Para quantificar a produção de oósporos (dados não apresentados) foram feitas contagens de oósporos em 10 cotilédones contendo oósporos para cada IPU ou combinação de IPU. Os cotilédones foram moídos individualmente num almofariz com 1 ml de água destilada e estimou-se o número de oósporos formado num cotilédone com um hemacitómetro. Para dar uma indicação da variação do número de oósporos produzidos em cotilédones que foram inoculados com o mesmo IPU ou combinação de IPU calcularam-se os desvios padrões.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No Quadro 1 apresenta-se a caracterização sexual dos 13 isolamentos de *A. candida* colhidos no campo e dos IPU deles derivados. Verifica-se que alguns dos isolamentos colhidos inicialmente no campo [Ac505 (Albogas, Loures) colhido em *B. oleracea* e Ac513 (Montes de Alvor, Portimão) colhido em *R. sativus*] apresentavam oósporos, ou seja, eram constituídos por misturas de talos com diferentes tipos de compatibilidade sexual, mas nos IPU deles derivados não foi detectada a presença de oósporos.

Os IPU daqueles dois isolamentos (Ac505 e Ac513), assim com os isolamentos de *B. oleracea* Ac503 (Costa de Caparica, Almada) e Ac504 (Santa Cruz, Torres Vedras) e todos os de *B. rapa*, são heterotáticos (auto-estéreis). Os IPU de Ac501 (Belinho, Esposende) e Ac502 (Lourinhã, Lourinhã) representam provavelmente um caso de homotalismo secundário porque: i) apresentaram alguns oósporos em número contabilizável, de cerca de 1 a 5 por cotilédone, ao contrário do inóculo colhido no campo, em que o número de oósporos era da ordem dos milhares; e ii) por se comportarem como heterotáticos quando combinados com outros isolamentos provenientes de hospedeiros homólogos (cf. Quadro 3).

Nos Quadros 2 e 3 apresenta-se o tipo de compatibilidade sexual dos IPU de *B. oleracea* e *B. rapa*, respectivamente, após inoculação em combinações pareadas de cotilédones de hospedeiros susceptíveis. Verifica-se que os IPU de *B. rapa* (Quadro 3) pertencem todos a um mesmo "mating type" (grupo de emparelhamento). Pelo contrário, nos IPU de *B. oleracea* (Quadro 2) podemos considerar a existência de dois grupos de compatibilidade sexual: i) constituído pelos IPU de Ac501 (Belinho, Esposende), Ac502 (Lourinhã, Lourinhã) e Ac504 (Santa Cruz, Torres Vedras); e ii) constituído pelos IPU de Ac503 (Costa de Caparica) e de Ac505 (Albogas, Loures). Estes resultados sugerem a possibilidade da existência de uma relação entre a proveniência geográfica dos isolamentos de *A. candida* e os dois "mating types" encontrados. Contudo o número reduzido de isolamentos utilizado não permite mais do que essa "especulação". Torna-se necessário a realização de mais estudos sobre o tema.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Jorge, L., 1996. Caracterização de isolamentos portugueses de *Albugo candida*. Dissertação de Mestrado em Horticultura. Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. (no prelo).
- Michelmore, R.W. & Ingram, D.S., 1980. Heterothallism in *Bremia lactucae*. Trans. Br. Mycol. Soc., 75:47-56.
- Michelmore, R.W. & Ingram, D.S., 1982. Secondary homothallism Heterothallism in *Bremia lactucae*. Trans. Br. Mycol. Soc., 75:47-56.
- Sansome, E. & Sansome, F.W., 1974. Cytology and life-history of *Peronospora parasitica* on *Capsella bursa-pastoris* and of *Albugo candida* on *C. bursa-pastoris* and on *Lunaria annua*. Trans. Br. Mycol. Soc., 62:323-332.
- Santos, M.P.; Dias, J.S. & Monteiro, A.A., 1996. Screening portuguese cole landraces for resistance to white rust [*Albugo candida* (Pers.) Kuntze]. In: Dias, J.S.; Crute, I. & Monteiro, A.A. (Eds.). Proc. International Symposium on Brassicas/Ninth Crucifer Genetics Workshop. Acta Horticulturae, 407:453-459.
- Savage, E.J.; Clayton, C.W.; Hunter, J.H.; Brennemam, J.A.; Laviola, C. and Gallely, M.E., 1968. Homothallism, heterothallism, and interspecific hybridization in the genus *Phytophthora*. Phytopathology, 58:1004-1021.
- Sequeira, P & Monteiro, A., 1996. Heterothallism and homothallism in Portuguese isolates of *Peronospora parasitica* (Pers. ex. Fr.) Fr.. Cruciferae Newsletter, 18:126-127.
- Sherriff, C. & Lucas, J.A., 1989a. Cytogenetic study of heterothallic and homothallic isolates of *Peronospora parasitica*. Mycol. Res., 92:302-310.
- Sherriff, C. & Lucas, J.A., 1989b. Heterothallism and homothallism in *Peronospora parasitica*. Mycol. Res., 92:311-316.
- Webster, J., 1980. Introduction to Fungi. Cambridge University Press, Cambridge. pp.186-190.



Quadro 1 - Lista e produção de oósporos dos 12 isolamentos de *A. candida* (Ac) colhidos no campo (C) e dos isolamentos de pústula única dele derivados (IPU).

Número <sup>1</sup>	Local de colheita	Hospedeiro <sup>2</sup>	Oósporos <sup>3</sup>	
			C	IPU
Ac 501	Belinho, Esposende	Couve-flor (Bo)	+	±
Ac 502	Lourinhã, Lourinhã	Couve-flor (Bo)	+	±
Ac 503	Costa de Caparica, Almada	Couve Portuguesa (Bo)	-	-
Ac 504	Santa Cruz, Torres Vedras	Couve Portuguesa (Bo)	-	-
Ac 505	Albogas, Loures	Couve Grelo (Bo)	+	-
Ac 506	Montes de Alvor, Portimão	Nabo (Br)	-	-
Ac 507	Santa Cruz, Torres Vedras	Couve Chinesa (Br)	-	-
Ac 508	Lourinhã, Lourinhã	Nabo (Br)	-	-
Ac 509	Costa de Caparica, Almada	Nabo (Br)	-	-
Ac 510	A-Ver-o-Mar, Póvoa de Varzim	Couve Chinesa (Br)	-	-
Ac 511	A-Ver-o-Mar, Póvoa de Varzim	Nabo (Br)	-	-
Ac 512	Aguçadoura, Póvoa de Varzim	Nabo (Br)	-	-
Ac 513	Montes de Alvor, Portimão	Rábano (Rs)	+	-

<sup>1</sup> Número de código do banco de isolamentos de crucíferas da Secção de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia;

<sup>2</sup> Bo = *B. oleracea*; Br = *B. rapa*; Rs = *Raphanus sativus* ; <sup>3</sup> + = oósporos presentes; - = oósporos ausentes; ± = presença ocasional de oósporos (1 a 5 por cotilédone inoculado).

Quadro 2 - Produção de oósporos de hospedeiros susceptíveis de *B. oleracea* após inoculação com isolamentos de pústulas única de *A. candida* (Ac), em combinações pareadas.

Isolamentos <sup>1</sup>	501	502	503	504	505
501	±				
502	-	±			
503	+	+	-		
504	-	-	+	-	
505	+	+	-	+	-

<sup>1</sup> Os números referem-se aos isolamentos de Ac listados no Quadro 1.

+ = oósporos presentes; - = oósporos ausentes; ± = presença ocasional de oósporos (1 a 5 por cotilédone inoculado).

Quadro 3 - Produção de oósporos em cotilédones de hospedeiros susceptíveis de *B. rapa* após inoculação com isolamentos de pústula única de *A. candida* (Ac), em combinações pareadas.

Isolamentos <sup>1</sup>	506	507	508	509	510	511	512
506	-						
507	-	-					
508	-	-	-				
509	-	-	-	-			
510	-	-	-	-	-		
511	-	-	-	-	-	-	
512	-	-	-	-	-	-	-

<sup>1</sup> Os números referem-se aos isolamentos de Ac listados no Quadro 1.; - = não se observou presença de oósporos.