

UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
INSTITUTO SUPERIOR DE AGRONOMIA

**CARACTERIZAÇÃO DE ISOLAMENTOS
PORTUGUESES DE MÍLDIO DAS CRUCÍFERAS**
(Peronospora parasitica (Pers. ex Fr.) Fr.)

Pedro Jesus Sequeira

MESTRADO EM PRODUÇÃO VEGETAL

LISBOA
1996

Dissertação apresentada no Instituto Superior de Agronomia para efeitos de obtenção do grau de Mestre em Produção Vegetal.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor António Almeida Monteiro, do Instituto Superior de Agronomia, na qualidade de orientador desta dissertação, pelos valiosos e inúmeros conhecimentos científicos que me transmitiu, pelo sincero apoio, interesse e disponibilidade que sempre manifestou pelo trabalho, pela maneira como me ensinou a ser um investigador e pelo grande rigor e exigência postos na revisão deste trabalho.

Ao Professor Doutor Ian Crute e à Doutora Debbie Leckie do Horticultural Research International, Wellesbourne, por me terem aceite num curto estágio onde aprendi a técnica de observação de oósporos, pelas sugestões na interpretação de dados, pela gentil cedência dos isolamentos P005 e P006 para as inoculações simultâneas com os isolamentos portugueses.

À Eng^a Agrícola Paula Santos Coelho, do Departamento de Horticultura e Floricultura do Instituto Nacional de Investigação Agrária, pela inestimável ajuda que deu nos trabalhos de laboratório, pelas preciosas ideias e sugestões prestadas no decorrer do trabalho e pela sincera amizade.

À Eng^a Técnica Agrária Luísa Valério pela gentileza, disponibilidade e prontidão que sempre demonstrou, no apoio prestado à execução do trabalho experimental.

Ao Professor Doutor João Carlos de Silva Dias, da Secção de Horticultura do Instituto Superior de Agronomia, pelo consentimento na utilização de algum material de laboratório.

À Eng^a Agrónoma Joana Vicente pela preciosa colaboração na realização dos trabalhos laboratoriais.

À Eng^a Agrónoma Maria José Monteiro da Silva do Centro de Estudos de Produção e Tecnologia Agrícolas do Instituto de Investigação Científica Tropical, pelo auxílio prestado no tratamento estatístico dos resultados.

Ao Eng^o Agrónomo Mário Rui Santos do Centro de Estudos de Produção e Tecnologia Agrícolas do Instituto de Investigação Científica Tropical, pelo interesse demonstrado neste trabalho e pelas ideias que me proporcionou ao longo dos trabalhos laboratoriais.

Aos colegas da Horta, Eng^a Agrícola Custódia Correia, Eng^a. Agrónoma Lurdes Jorge e Eng^o Agrónomo Kiril Bachcevandziev pelo bom ambiente de trabalho que proporcionaram.

À E.S.A. C.B. pelos meios que disponibilizou e pelas facilidades concedidas ao longo do trabalho.

Ao pessoal do Centro de Recursos da E.S.A. C.B. em especial à Anabela Sanches pelo processamento do texto, arranjo gráfico, ilustrações e reprodução do documento final.

À minha Família pelo estímulo, apoio e compreensão durante todo o tempo de execução deste trabalho.

A todos os meus amigos, colegas e colaboradores que directa ou indirectamente me apoiaram e incentivaram.

3 - Aspectos macroscópicos e microscópicos do	
<i>Peronospora parasitica</i> (Pers. ex Fr.) Fr. em Portugal	26
3.1 - Introdução	26
3.2 - Material e métodos	27
3.2.1 - Origem geográfica dos isolamentos	27
3.2.2 - Obtenção dos isolamentos	28
3.2.2.1 - Colheita	28
3.2.2.2 - Manutenção	30
3.2.2.3 - Conservação	31
3.2.3 - Preparação do material para registos fotográficos	32
3.3 - Resultados e discussão	33
3.3.1 - Descrição geral	33
3.3.2 - Aspectos particulares	41
4 - Heterotalismo e homotalismo em isolamentos portugueses de	
<i>Peronospora parasitica</i> (Pers. ex Fr.) Fr.	49
4.1 - Introdução	49
4.2 - Material e métodos	50
4.2.1 - Obtenção de isolamentos por esporo único	51
4.2.2 - Inoculação simultânea de dois isolamentos de <i>Peronospora parasitica</i>	53
4.2.3 - Preparação do material vegetal para análise microscópica	54
4.3 - Resultados e discussão	54
5 - Caracterização morfológica dos conídios de	
<i>Peronospora parasitica</i> (Pers. ex Fr.) Fr.	62
5.1 - Introdução	62
5.2 - Material e métodos	64
5.3 - Resultados e discussão	65
6 - Conclusões	72
7 - Bibliografia	75

CARACTERIZAÇÃO DE ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE MÍLDIO
DAS CRUCÍFERAS (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.)

Resumo

O míldio das crucíferas (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) é considerado uma doença bastante importante nas brássicas em Portugal.

Quinze isolamentos de *P. parasitica* provenientes de várias regiões de Portugal, foram examinados em laboratório, com o objectivo de caracterizar os tipos de emparelhamento e variabilidade, e as diferenças morfológicas entre os conídios.

Apuraram-se avanços metodológicos para a observação e descrição geral do fungo.

Observou-se pela primeira vez a presença de conídios com formas anormais nos isolamentos de Odemira, Batalha, Vila Real e Lourinhã. Foram consideradas algumas hipóteses para explicar o fenómeno.

O estudo do acasalamento dos isolamentos obtidos por esporo único, com os isolamentos P005 e P006 do Reino Unido pertencentes aos tipos de compatibilidade sexual (SCT) P1 e P2 (Sherriff e Lucas, 1989b), mostrou a existência de 3 isolamentos do tipo P1, 10 do tipo P2 e 2 auto-compatíveis.

As dimensões dos conídios revelaram a presença de formas circulares, ovais e alongadas e não houve diferenças aparentes na forma dos esporos em todos os isolamentos. O mesmo isolamento produziu conídios de tamanho diferente em 3 repetições, indicando o efeito do meio sobre este parâmetro.

Os 15 isolamentos portugueses parecem não apresentar diferenças morfológicas, mas houve eventual diferenças do tipo genético e /ou fisiológico.

Não se encontrou nenhuma relação entre a forma dos conídios, a origem geográfica e o tipo de acasalamento nos 15 isolamentos.

Palavras chave: crucíferas, brássicas, míldio, *P. parasitica*, isolamentos, conídios, oósporos, tipo de acasalamento, homotalismo, heterotalismo.

CHARACTERIZATION OF PORTUGUESE ISOLATES OF CRUCIFER'S
DOWNY MILDEWS (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.)

Abstract

Downy mildew of crucifers caused by *P. parasitica* is considered an important disease on cultivated brassica in Portugal.

Fifteen isolates of *P. parasitica* from various regions of Portugal were examined under laboratory conditions to characterize on the one hand sexual compatibility types (SCT) and variability, and on the other hand morphological differences of conidia.

Advance in methods for observation and general description of the fungus was achieved.

The presence of conidia with anomalous forms was observed for the first time in isolates from Odemira, Batalha, Vila Real and Lourinhã. Some explanations for this fact were proposed.

The study of mating types of the Portuguese isolates obtained by the single spore technique with isolates P005 and P006 from the U.K., belonging to two sexual compatibility types P1 and P2 (Sherriff and Lucas, 1989b) showed the existence of 3 P1 type isolates, 10 P2 type isolates and 2 self-compatible isolates.

The average measurements of the conidia revealed the presence of circular, oval and elongated forms. Three laboratory tests indicating the effect of the environment on size showed that the same isolate produced conidia with different sizes.

The fifteen Portuguese isolates did not present any morphological differences. The isolates presented differences on mating types and the possibility of some differences in genetical and physiological types.

Key words: crucifers, brassicas, downy mildew, *P. parasitica*, isolates, conidia, oospores, mating type, homothallism, heterothallism.

Lista de figuras

- Figura 2.1 - Ciclo de vida do fungo *P. parasitica*. (Adaptado de Williams, 1985). 17
- Figura 2.2 - Ciclo da doença do míldio. (Adaptado de Williams, 1985). 21
- Figura 2.3 - Quando as condições do meio são favoráveis, o fungo *P. parasitica* desenvolve-se e esporula nas lesões da parte abaxial da folha. (Adaptado de University of California, 1992). 23
- Figura 2.4 - Ataque de *P. parasitica* a cabeças de couve-flor, produzindo manchas negro-violáceas debaixo do tecido cortical (adaptado de University of California, 1992). 23
- Figura 3.1 - Locais do território continental onde os isolamentos foram recolhidos. 29
- Figura 3.2 - Cotilédone de CrGC 3.4 apresentando um manto de conidióforos na sua parte abaxial. (Ampl. 4x). 33
- Figura 3.3 - Cotilédones de CrGC 3.4 com as partes adaxiais completamente colonizadas com *P. parasitica*. (Ampl. 4x). 34
- Figura 3.4 - Página inferior de um cotilédone de CrGC 3.4 coberto com um manto de conidióforos e conídios. (Ampl. 21x). 35
- Figura 3.5 - Aspecto do mesmo cotilédone de CrGC 3.4 da Figura 3.4 ampliado 53x. 35
- Figura 3.6 - Aspecto de um conidióforo e conídios de *P. parasitica* emergindo dum cotilédone de *Brassica oleracea*. (Ampl. 53x). 36
- Figura 3.7 - Haustório de forma lobular envolvido completamente pela membrana (sheath). Preparação com lactofenol. (Ampl. 534 x). 36
- Figura 3.8 - Pormenor de dois haustórios de forma globular, notando-se os estreitos e pequenos pedúnculos de ligação com o micélio intercelular. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x). 37

Figura 3.9 - Aspecto curioso de dois haustórios de <i>P. parasitica</i> na mesma célula do hospedeiro. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	37
Figura 3.10 - Típico conidióforo de <i>P. parasitica</i> com o eixo principal ramificado dicotomicamente em ângulos agudos. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).	38
Figura 3.11 - Conidióforo e conídios de <i>P. parasitica</i> observados em cotilédones de CrGC 3.4. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).	38
Figura 3.12 - Típico conidióforo de <i>P. parasitica</i> com a maior parte dos conídios nos esterigmas. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	39
Figura 3.13 - Aspecto de conídios de <i>P. parasitica</i> com formas circulares e ovais. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	39
Figura 3.14 - Aspecto de conídios de <i>P. parasitica</i> de forma elipsoidal. Preparação corada com lactofenol. (Ampl. 534x).	40
Figura 3.15 - Pormenor de um conídio de <i>P. parasitica</i> germinando por tubo germinativo. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).	40
Figura 3.16 - Conídios do isolamento proveniente de Vila Real apresentando formas anormais. Preparação utilizando azul de algodão. (Ampl. 534x).	42
Figura 3.17 - Pormenor de dois conídios com forma anormal. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).	43
Figura 3.18 - Aspecto de um conídio de forma anormal ligado a um ramo de conidióforo. Note-se a forma de "garrafa" que o conídio apresenta. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	43
Figura 3.19 - Contraste entre um conídio de forma normal (a), com um de forma anormal (b). Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	44
Figura 3.20 - Conidióforo e conídios de formas "esquisitas". Note-se o comprimento anormal dos esterigmas e a diminuta absorção do corante. Preparado com azul de algodão. (Ampl. 534x).	44
Figura 3.21 - Pormenor de conídio de forma anormal ligado a um longo e encurvado esterigma. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	45
Figura 3.22 - Aspecto de um conidióforo e conídios no início da formação das formas "esquisitas". Note-se: (a) alongamento em bico dos conídios; (b) arredondamento do mesmo bico; (c) conídio com a forma anormal. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).	45

- Figura 3.23** - Aspecto de um conidióforo com vários conídios com formas anormais ligados a esterigmas muito encurvados. Note-se o pormenor da limitada absorção do azul de algodão pelo citoplasma. (Ampl. 534x). 46
- Figura 3.24** - Aspecto do alongamento dum conídio anormal, parecendo que apresenta na extremidade um outro esporo com a forma normal, notando-se a distribuição do citoplasma em toda a estrutura. Preparação em lactofenol. (Ampl. 534x). 46
- Figura 3.25** - Pormenor de dois conídios de forma anormal que parecem a sofrer um alongamento, notando-se que o citoplasma desses conídios parece não absorver convenientemente o azul de algodão da preparação. (Ampl. 534x). 47
- Figura 3.26** - Conídio de forma anormal parecendo estar a bifurcar-se em dois longos ramos, vendo-se numa das extremidades um novo conídio. Preparação em lactofenol. (Ampl. 534x). 47
- Figura 4.1** - Esporulação de *P. parasitica* num cotilédone de CrGC 3.4 inoculado com esporo único. Note-se que os dois outros cotilédones que serviram de testemunhas não apresentam nenhuma esporulação. 53
- Figura 4.2** - Aspecto de oósporos de *P. parasitica* obtidos do cruzamento entre os míldios P508 (Condeixa) x P006 (Reino Unido). Preparação em lactofenol. (Ampl. 133x). 55
- Figura 4.3** - Pormenor de oósporo de *P. parasitica* proveniente de cruzamento entre P508 (Condeixa) x P006 (Reino Unido), notando-se a dupla parede. Preparação em lactofenol. (Ampl. 534x). 56
- Figura 5.1** - Intervalos de confiança das larguras dos conídios ($P \leq 95\%$, Scheffé). Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2. 67
- Figura 5.2** - Intervalos de confiança dos comprimentos dos conídios ($P \leq 95\%$, Scheffé). Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2. 67
- Figura 5.3** - Intervalos de confiança do quociente comprimento/largura dos conídios ($P \leq 95\%$, Scheffé). Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2. 69
- Figura 5.4** - Gráfico representando as médias de comprimento versus largura dos conídios. Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2. Os 3 grupos de isolamentos referem-se aos três grupos de testagem. 69

Lista de quadros

Quadro 3.1 - Hospedeiros e origem geográfica dos isolados.	28
Quadro 4.1 - Características dos isolamentos de <i>P. parasitica</i> provenientes do Reino Unido (adaptado de Moss <i>et al</i> , 1994).	51
Quadro 4.2 - Percentagem de cotilédones com oósporos ^(a) nos cruzamentos entre 15 isolamentos portugueses de <i>Peronospora parasitica</i> e dois isolamentos do Reino Unido	57
Quadro 4.3 - Tipo de compatibilidade sexual (SCT) de quinze isolamentos de <i>P. parasitica</i> portugueses e dois do Reino Unido.	58
Quadro 5.1 - Delineamento experimental para a caracterização morfológica dos conídios de <i>P. parasitica</i> .	64
Quadro 5.2 - Largura, comprimento e quociente comprimento/largura dos conídios de 15 isolamentos de <i>P. parasitica</i> em cotilédones de CrGC 3.4..	66

Introdução

1

1 - INTRODUÇÃO

As brássicas são cultivadas no mundo inteiro numa área superior a 2 milhões de hectares, cabendo aos 15 países da Comunidade Europeia (C.E.), cerca de 267.000 hectares, num total de 422.000 hectares para toda a Europa (F.A.O., 1992).

Em Portugal, mais do que em qualquer outro país da Europa, as plantas cultivadas do género *Brassica* têm um papel preponderante. A produção hortícola nacional é caracterizada pela grande produção e consumo de couves, sobretudo couve-lombarda, repolho, brócolo e couve-portuguesa. O consumo de couves em Portugal é um dos mais elevados do mundo com cerca de 750.000 t/ano, o que corresponde a uma capitação de aproximadamente 75 Kg/ano (Portas e Costa, 1977). O maior consumo é da couve-lombarda (*B. oleracea* var. *sabauda*), próximo dos 42 Kg/hab/ano, seguido da couve-portuguesa (*B. oleracea* var. *costata*) com cerca de 19 Kg/hab./ano. Rosa (1991) sugere que estas capitações são variáveis de região em região, podendo nalguns casos atingir valores mais elevados ou favorecer a couve-portuguesa em detrimento da couve-lombarda, como acontece na região de Trás-os-Montes. Presentemente, o consumo de couves em Portugal mostra uma tendência para diminuir, ao mesmo tempo que aumenta a diversificação de hortaliças. A redução do consumo tem-se feito sentir principalmente nas couves de folhas, como é o caso da couve Tronchuda e Galega (Monteiro, 1990).

Nas últimas décadas, o melhoramento de várias formas cultivadas de *Brassica oleracea* tem sido notável, tendo-se dado particular atenção à produção de cultivares híbridas F₁, o que deu origem a um grande aumento da produção por unidade de área e também da qualidade do produto. Contudo, esse melhoramento pouco

incidiu na resistência às doenças e pragas, ao contrário do que acontece com outras culturas hortícolas, nomeadamente o tomate e o pepino.

Recentemente, tem-se observado nos países desenvolvidos um novo interesse pelas brássicas, relacionado com o seu valor alimentar. Estas plantas são ricas em fibras, que ajudam na regularização e bom funcionamento do aparelho digestivo, em vitaminas B e C, em carotenos e em minerais. As fibras e os carotenos possuem acção reconhecidamente anticancerígena, o que recomenda a inclusão de couves na dieta alimentar humana, para a prevenção deste tipo de doenças (Font Quer, 1988; Dias, 1992; Rosa, 1992).

As brássicas só serão culturas com futuro, se o melhoramento para resistência às doenças e às pragas puder acompanhar a pressão dos consumidores e das normas europeias sobre agricultura sustentável, permitindo a utilização de plantas resistentes que necessitem menos agroquímicos. Enquadrado nesta filosofia está o projecto comunitário intitulado **"The location and exploitation of genes for pest and disease resistance in European gene bank collections of horticultural brassicas"** em que colabora a Secção de Horticultura do Departamento de Produção Agrícola e Animal (DPAA) do Instituto Superior de Agronomia (ISA) com a realização de estudos sobre resistência ao míldio e às pústulas brancas (sin. ferrugem branca) em brássicas. O trabalho experimental que serviu de base à preparação desta dissertação decorreu no âmbito deste projecto.

O míldio das crucíferas (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.) é uma doença bastante importante nas brássicas cultivadas em Portugal, já que existem condições favoráveis de temperatura e humidade para o desenvolvimento do fungo durante grande parte do ano. A importância das brássicas no nosso país e a sua permanente convivência com o míldio levou a que se tenham realizado alguns trabalhos sobre a resistência das couves portuguesas a esta doença (Monteiro e Williams 1989; Dias *et al.*, 1993; Sousa *et al.*, 1994; Carvalho, 1995), que conduziram à identificação de plantas com interessante resistência genética ao fungo (Sousa *et al.*, 1994; Carvalho, 1995). A investigação sobre a variação genética na *Brassica oleracea* em busca de material resistente a doenças como o míldio ou as pústulas brancas, ainda vai no início, havendo muitos "buracos negros" que terão de ser consistentemente investigados e devidamente explicados.

O estudo da interacção entre o hospedeiro e o agente patogénico ao nível morfológico, anatómico e fisiológico é importante para compreender o fenómeno da doença nas plantas. O conhecimento da forma como o hospedeiro e o parasita interactuam é de grande importância no desenvolvimento de métodos de controlo genético da reacção do hospedeiro ao ataque do agente patogénico, no campo do melhoramento das plantas. Neste contexto e relacionado com a realização de testes de avaliação da resistência a doenças "disease screening", surge-nos o conceito de **fenótipo da interacção (IP)** (Williams, 1989), termo geral que envolve todos os fenótipos que resultam da interacção entre a planta, um simbionte e o meio. O

conceito de IP fornece descrições mais precisas das interações, que podem ser quantificadas em termos de efeitos positivos ou negativos, no hospedeiro ou no agente patogénico. No âmbito do conceito de IP, podem incluir-se manifestações diversas de interação, que vão desde os efeitos benéficos de simbioses mutualísticas até à expressão dos sintomas da doença ou dos sinais do agente patogénico.

Seguindo a linha de pensamento de Williams (1989), deve-se concordar que o melhoramento para resistência a doenças necessita do conhecimento profundo da genética, ecologia, biologia do desenvolvimento e da reprodução, fisiologia e técnicas culturais da cultura, assim como duma compreensão abrangente do próprio agente patogénico, para além do entendimento do papel complexo do meio. O conhecimento da ecologia do parasita, sua epidemiologia, reprodução e genética, é de particular importância, levando o melhorador a estar ciente da existência de variabilidade patogénica e do potencial que um organismo possui para gerar novas formas patogénicas. Será muito difícil encontrar formas de resistência genética a uma doença sem antes conhecer suficientemente o agente patogénico que a provoca.

Quando se procuram novas fontes de resistência, é importante um conhecimento adequado da variação e distribuição de *formae speciales* e de raças fisiológicas (patotipos) para a determinação dos locais mais apropriados aos testes de avaliação no campo ou à recolha de isolamentos. Os locais mais apropriados, são aqueles onde o agente patogénico é endémico e/ou sazonalmente epidémico e onde existe um máximo de variação na patogenicidade (Williams, 1989).

Tendo presente a afirmação de Williams (1989): "para haver um eficaz programa de melhoramento sobre resistência a doenças, um conhecimento abrangente do agente patogénico é tão importante como o conhecimento do hospedeiro", houve a necessidade de estudar o agente patogénico causador do míldio das crucíferas, o fungo *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.. Este fungo não tem sido objecto de muita atenção a nível mundial e em Portugal, não é suficientemente conhecido. Assim, justifica-se o presente trabalho, realizado no período de Outubro de 1993 a Agosto de 1995. Não sendo um clássico de patologia vegetal, pretende dar um contributo na área da horticultura, em especial no campo do melhoramento sobre aspectos mais relacionados com o agente patogénico, que poderão eventualmente ajudar a melhor compreender e interpretar os fenómenos inerentes à relação hospedeiro-parasita.

Os objectivos gerais do trabalho são:

- apurar técnicas laboratoriais adequadas para uma descrição geral do *P. parasitica* de várias regiões de Portugal;
- verificar os tipos de acasalamento e variabilidade apresentados pelos isolamentos portugueses de *P. parasitica*, podendo obter informação sobre fenómenos de heterotalismo e homotalismo;

- avaliar as diferenças morfológicas dos conídios com a intenção de encontrar variabilidade entre formas homotáticas e heterotáticas.

O trabalho está dividido em 6 capítulos, incluindo a presente introdução geral. O capítulo 2 contém uma revisão bibliográfica onde se reúne informação mais relevante publicada sobre o *P. parasitica*. O capítulo 3 consiste na descrição geral do fungo com a ajuda de material fotográfico e técnicas laboratoriais adequadas. A caracterização de formas homotáticas e heterotáticas de vários isolamentos de *P. parasitica* é apresentada no capítulo 4. No capítulo 5 procede-se ao estudo morfológico dos isolamentos, incidindo sobre os comprimentos, larguras e formas dos conídios, procurando com isso características de variabilidade entre formas homotáticas e heterotáticas encontradas de *P. parasitica*. Finalmente, no capítulo 6 são apresentadas as conclusões sobre os resultados obtidos e discutidos nos três capítulos anteriores.

Revisão
Bibliográfica

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O agente patogénico

2.1.1. Classificação

De acordo com o "Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi" 8ª ed. (Hawksworth *et al.*, 1994), o míldio das crucíferas é classificado da seguinte maneira:

Reino	<i>Fungi</i>
Divisão	<i>Eumycota</i>
Sub-divisão	<i>Mastigomycotina</i>
Classe	<i>Oomycetes</i>
Ordem	<i>Peronosporales</i>
Família	<i>Peronosporaceae</i>
Género	<i>Peronospora</i>
Espécie	<i>Peronospora parasitica</i> (Pers. ex Fr.)Fr.

2.1.2. Morfologia

A morfologia do fungo *P. parasitica* é semelhante à de outros membros da família *Peronosporaceae*.

Do ponto de vista microscópico, o fungo possui um micélio hialino, cenocítico (sem septos), que se ramifica nos espaços intercelulares do hospedeiro, formando grandes haustórios de aspecto globular a lobulado que penetram nas células dos tecidos infectados. Os conidióforos emergem isolados ou em grupos através dos estomas, apresentam-se dicotomicamente ramificados, com grupos de conídios terminais que facilmente se desprendem por causa do movimento do ar, ou por mudanças na humidade relativa (Channon, 1981; Williams, 1985).

Macroscopicamente, o fungo apresenta um tapete de conidióforos de cor branca, finamente denso, que pode estar disperso em todas as direcções, situando-se normalmente na parte abaxial das folhas sob lesões cloróticas ou parcialmente necróticas (Williams, 1985).

2.1.3. Esporulação

2.1.3.1. Definição da terminologia

Para melhor entender os principais aspectos da morfologia e do ciclo de vida do *P. parasitica*, tem-se de concordar com Channon (1981), ao considerar conveniente abordar, em primeiro lugar, os estados reprodutivos (esporulativos) do fungo.

Segundo Carlile e Watkinson (1995) o termo “reprodução” (sexual e assexual) é utilizado muitas vezes como sinónimo de esporulação (sexual e assexual), reflectindo as origens botânicas da micologia. Os esporos têm sido vistos como análogos às sementes das plantas na criação de novos indivíduos e a esporulação como “reprodução”. Este ponto de vista tem alguma validade no que diz respeito aos fungos filamentosos, que produzem esporos que se dispersam rapidamente. Contudo, no que diz respeito às leveduras, o processo pelo qual são produzidos novos indivíduos é o crescimento vegetativo e a divisão celular. O processo de esporulação está relacionado com a sobrevivência e dispersão nas leveduras pertencendo aos Ascomycetas e aos Basidiomycetas, em vez do aumento do número de indivíduos. Mesmo nos fungos filamentosos, os novos indivíduos podem resultar da expansão das hifas e do subsequente esvaziamento do protoplasma do micélio. Carlile e Watkinson (1995) afirmam, então, que o termo “reprodução” é ambíguo

no contexto dos microorganismos, sendo preferível utilizar o termo “esporulação” que é mais explícito. É esta a opinião que se segue no presente trabalho.

2.1.3.2. Esporulação assexuada

A morfologia e o desenvolvimento dos conidióforos no *P. parasitica* foram estudados pela primeira vez, em material vivo e em preparações, por Davison (1968b) e complementados pelos estudos de Chou (1970), com o microscópio electrónico, sobre a penetração do hospedeiro pelo agente patogénico e as fases iniciais da formação de haustórios.

A morfogénese das estruturas assexuadas de *P. parasitica* pode ser dividida em cinco fases (Davison, 1968b):

- 1^a) formação do primórdio do conidióforo;
- 2^a) formação do conidióforo não ramificado;
- 3^a) fase da ramificação do conidióforo;
- 4^a) formação e maturação do esporo;
- 5^a) formação do tabique "cross wall".

Os conidióforos são produzidos na escuridão, inicialmente como hifas não ramificadas, a partir de conjuntos de micélios intercelulares, por baixo da epiderme do hospedeiro, projectando-se individualmente ou em grupos através dos estomas. As hifas se forem similares, são capazes de penetrar e emergir entre células normais da epiderme (Chou, 1970).

As hifas diferenciam-se formando os conidióforos, que ao atingirem a maturação, medem cerca de 200 a 500 μm de comprimento. Elas suportam ramificações primárias e secundárias, que geralmente se formam quando os conidióforos alcançam dois terços da sua altura final (Davison, 1968b). As ramificações secundárias bifurcam-se em pares de finos esterigmas, pontiagudos ou encurvados, que suportam conídios terminais singulares, sendo ao princípio esféricos, mas tornando-se mais ou menos elípticos (24-27 x 12-22 μm), estando delimitados dos esterigmas por “cross-walls” quando atingem a maturação. Todo o processo que vai desde a emergência do conidióforo até à formação dos conídios, tem uma duração aproximada de 4 a 6 horas e a taxa de alongamento do conidióforo atinge 100 a 200 μm por hora, a uma temperatura de 8°C (Davison, 1968b). Felton e Walker (1946) indicam que a esporulação é mais rápida entre 8-16°C com a humidade relativa igual a 100% e Williams (1985) recomenda 16°C como a temperatura mais propícia para uma óptima esporulação.

A libertação dos esporos de *P. parasitica* é afectada principalmente pela torção e distorção higroscópica dos conidióforos em resposta às mudanças na humidade do

ar (Pinckard, 1942), mas pode existir um período transitório de libertação de esporos antes do início duma chuvada enquanto os esporos estão secos (Hirst e Stedman, 1963).

A sobrevivência dos conídios do fungo depende principalmente do ambiente em que são mantidos, podendo permanecer viáveis no inverno até aos 110 dias, quando armazenados em solo seco, enquanto que duram um máximo de 10 dias quando mantidos ao ar livre em folhas de couve-rábano (Krober, 1970). O período de sobrevivência também se reduz dos 110 para os 22 dias se o solo for humedecido. Quando os esporos são armazenados em solo seco à temperatura de 5°C, podem ficar viáveis até 130 dias (Krober, 1970).

Tem sido estudada a preservação de conídios com diferentes aditivos utilizando uma temperatura de -21°C (Paul e Klodt-Bussmann, 1993), ou com protectores criogénicos e congelação em azoto líquido a -80°C, obtendo ao fim de um ano altas taxas de germinação (Satou e Fukumoto, 1993). A preservação de conídios viáveis de *P. parasitica* pode ser feita por mais de 4 anos usando a técnica “Dry Spore Fast Freeze (DSFF)” (Gulya *et al.*, 1993). Os esporos secos ao ar são aspirados com um colectador especial para um tubo de polipropileno isento de protectores criogénicos, e são imediatamente colocados num contentor contendo azoto líquido.

2.1.3.3. Esporulação sexuada

O *P. parasitica* sendo da classe *Oomycetes*, apresenta oósporos, que são esporos em estado de dormência provenientes de oosferas fertilizadas.

Durante a esporulação sexuada, o *P. parasitica* forma oogónios esféricos e anterídios do tipo “paragynous”, isto é, tendo o anterídio ao lado do oogónio (Alexopoulos e Mims, 1979; Webster, 1980; Channon, 1981; Carlile e Watkinson, 1995). Os primeiros estudos efectuados por Wager (1889), no hospedeiro *Capsella bursa-pastoris*, indicam a existência de órgãos sexuais masculinos e femininos na mesma hifa e em hifas diferentes. Os anterídios são estruturas relativamente curtas que pouco a pouco se ligam aos lados dos oogónios. Na *Brassica oleracea*, o fungo *P. parasitica* forma anterídios longos de aspecto entrelaçado, que parecem surgir de hifas separadas das que sustentam os oogónios (McMeekin, 1960).

Estudos sobre o modo de fertilização de *P. parasitica* em *Capsella*, efectuados por Wager (1900), confirmados por Sansome e Sansome (1974) e Sherrif e Lucas (1989a) demonstram que:

- o protoplasma do oogónio diferencia-se num ooplasma central vacuolado e num periplasma periférico, granular e multinucleado;
- forma-se no oogónio uma papila receptiva, precisamente no local onde o anterídio e o oogónio entram em contacto e onde a parede do

- oogónio se torna mais fina para que o tubo fertilizador do anterídio penetre no oogónio;
- os núcleos do oogónio e do anterídio sofrem uma mitose antes da fertilização;
 - o tubo fertilizador, depois de penetrar no oogónio, cresce em direcção a um corpo central atractivo mas mal definido, localizado no ooplasma e aí descarrega um único núcleo “macho”. Entretanto, um único núcleo “fêmea” separa-se do periplasma e também migra para o corpo central;
 - os dois núcleos juntam-se após um certo tempo e iniciam o oósporo uninucleado;
 - durante a maturação, o periplasma deposita-se na parede do oósporo como uma camada exosporial.

O oósporo ao atingir a maturidade apresenta uma parede espessa, cor amarelada-acastanhada e forma esférica, medindo cerca de 26 a 45 μm de diâmetro.

A formação dos oósporos é favorecida por deficiências em azoto, fósforo ou potássio, que induzem à senescência dos tecidos de hospedeiros susceptíveis ao *P. parasitica* (McMeekin, 1960). É por esta razão que Channon (1981) afirma poder encontrar oósporos em grande quantidade em folhas cloróticas ou necróticas, mas não em tecidos verdes, sendo essa ocorrência mais frequente nos cotilédones - senescem mais depressa -, do que em folhas verdadeiras. Pelo contrário, Crute (informação pessoal) considera a formação de cloroses e necroses associada à presença de oósporos, como uma consequência e não uma causa da esporulação sexuada. Sendo os oósporos maiores consumidores de energia do que os conídios durante o seu processo de formação, as necroses e cloroses aparecem em resultado do maior consumo de nutrientes pelo fungo.

O *P. parasitica* apresenta formas heterotálicas e homotálicas, sendo este assunto desenvolvido em detalhe no capítulo 4.

2.1.4. Processo de infecção

2.1.4.1. Forma de infecção

A infecção é o processo pelo qual os agentes patogénicos estabelecem contacto com as células e os tecidos dum hospedeiro susceptível, obtendo dele os nutrientes (Agrios, 1978).

Quando um fungo entra em contacto com uma planta podem acontecer quatro situações possíveis, nomeadamente doença, simbiose mutualística, resistência ou nenhuma reacção (Carlile e Watkinson, 1995). Estas situações podem ocorrer em qualquer planta, dependendo do tipo de fungo. As plantas têm a capacidade de reconhecer ou não reconhecer o fungo, já que este, por intermédio de "indutores ou elicitores" (Rodrigues, 1980) activa ou não diferentes genes responsáveis pela produção de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina (HRGPs) que são componentes da parede celular.

Para além de reconhecerem os agentes patogénicos dos não patogénicos, as plantas podem distinguir entre raças de agentes patogénicos que transportam os genes de virulência e não virulência, tendo os últimos capacidade de induzir respostas por parte dos hospedeiros que bloqueiam os processos normais da doença. Quando uma planta reconhece um fungo, muitos genes são activados. Este aspecto tem sido intensivamente estudado, particularmente em termos de resistência, revelando um conjunto de respostas muito mais complexas do que aquilo que há uns anos atrás se suspeitava (Carlile e Watkinson, 1995).

Durante a infecção, os agentes patogénicos crescem e/ou multiplicam-se dentro dos tecidos. Dependendo da maior ou menor susceptibilidade do hospedeiro, a invasão pode ser de grande ou de pequena proporção. O modo como a infecção decorre tem sido bastante estudado no que respeita aos conídios de *P. parasitica* (Chu, 1935; Felton e Walker, 1947; Krober, 1969; Chou, 1970; Shiraishi *et al.*, 1975), assim como aos oósporos (LeBeau, 1945; Chiu, 1959; McMeekin, 1960; Chang *et al.*, 1963; Natti *et al.*, 1967; Moss *et al.*, 1994).

2.1.4.2. Conídios

Quando os conídios de *P. parasitica* entram em contacto com a superfície de um hospedeiro susceptível, se as condições ambientais são favoráveis, formam tubos germinativos dos quais se desenvolvem apressórios, iniciando-se o processo de infecção. Os apressórios são estruturas especializadas para fortes ligações, que se formam nas extremidades das hifas (Carlile e Watkinson, 1995). No caso da couve-flor, os apressórios encontram-se na junção das paredes anticlinais das células da epiderme (Preece *et al.*, 1967), o que foi confirmado por Chou (1970) para a couve-repolho. É nessa zona que se dá a penetração do fungo (Chu, 1935; Tsu, 1936; Iwata, 1943).

O conteúdo do conídio introduz-se no apressório, de onde se desenvolve uma hifa com capacidade de infectar (Chou, 1970). Esta hifa pode eventualmente entrar nos tecidos através dos estomas, mas a penetração directa é a mais frequente (Tsu,

1936; Wang, 1949; Shiraishi *et al.*, 1975) através dum orifício de 4 a 5 μm de diâmetro, aberto na cutícula (Chou, 1970). Não há provas de erosão da cutícula na vizinhança do apressório ou de degradação da parede à volta da hifa que penetra, pelo que a penetração da hifa na epiderme do hospedeiro é um processo essencialmente mecânico. Parece haver contudo, ajuda de agentes químicos na formação do haustório, ao existir degradação inicial da parede do hospedeiro, para permitir que o haustório ainda incipiente passe no orifício. Como este fica completamente fechado à volta do haustório em expansão, não ficam sinais óbvios de degradação da parede (Chou, 1970).

Após a entrada no hospedeiro, a hifa expande-se para um diâmetro de 7-8 μm e cresce inicialmente na região da lamela média entre as paredes anticlinais das células da epiderme (Chu, 1935 ; Chou, 1970). Em hospedeiros susceptíveis a hifa continua a crescer entre as células do parênquima, ramificando-se em todas as direcções e variando no diâmetro e na forma de acordo com o tamanho e a forma dos espaços intercelulares (Wang, 1949; Chou, 1970). Em contrapartida, em hospedeiros resistentes, as células que rodeiam a hifa “invasora” morrem, encontrando o fungo dificuldades em formar haustórios, podendo morrer por falta de nutrientes ou pela acção das toxinas (Wang, 1949).

A infecção pode ser iniciada por um esporo único (Krober, 1969; Sherriff e Lucas, 1989; Mosset *et al.*, 1994), mas a intensidade e a taxa de infecção aumentam com o aumento do número de esporos no inóculo, sendo frequente a utilização de concentrações que vão de 2 a 5 x 10⁴ até 10⁵ esporos ml⁻¹ (Natti *et al.*, 1967; Greenhalgh e Dickinson, 1975; Kluczewski e Lucas, 1982; Kluczewski e Lucas, 1983; Williams, 1985; Lucas *et al.*, 1988; Sherriff e Lucas, 1989; Sherriff e Lucas, 1990; Moss *et al.*, 1994, Sousa *et al.*, 1994; Carvalho, 1995).

As taxas de germinação dos esporos e de penetração no hospedeiro são muito afectadas pela temperatura (Channon, 1981). Os conídios a 15° C germinam em 4-6 horas, formam apressórios ao fim de 12 horas e penetram no hospedeiro em 18-24 horas (Chu, 1935)

2.1.4.3. Oósporos

O fungo *P. parasitica* quando exposto a períodos em que as condições são desfavoráveis, possui importantes meios de sobrevivência, os oósporos. LeBeau (1945) apresenta fortes provas sobre a responsabilidade dos oósporos na infecção primária de plântulas de couve-repolho e sugere, que o agente patogénico passa o verão em infestantes da família das crucíferas. Em contrapartida, Natti (1958) não confirma a existência de hospedeiros alternativos e aventa a hipótese de que o fungo sobrevive no inverno sob a forma de oósporos. Chiu (1959) trabalhando com couve

chinesa considera, que os oósporos são agentes de infecção primária, o que foi confirmado por Chang *et al.* (1963) em plântulas da mesma couve. McMeekin (1960) não conseguiu induzir nem obter infecção com oósporos em plantas susceptíveis, utilizando armazenamento do material vegetal infectado por 5 meses a temperaturas entre -10^oC e 27^oC e alternância frequente com temperaturas entre -10^oC e 15^oC. Como a infecção por oósporos não foi demonstrada (McMeekin, 1960), permanece incompletamente respondida a questão dos oósporos de *P. parasitica* servirem de inóculo primário. Williams (1985) levanta a mesma questão e, até à data, nenhum artigo científico foi publicado com resultados que possam cabalmente responder a este problema.

Embora se levantem dúvidas sobre se os oósporos são ou não importantes na infecção de plantas susceptíveis, está provado que a invasão do hipocótilo das brássicas - couve-repolho, couve-flor e couve-brócolo - pode ocorrer a partir de inóculo proveniente do solo (LeBeau, 1945; Chang *et al.*, 1963).

2.1.4.4. Formação de haustórios

A maioria dos fungos patogénicos incluindo o *P. parasitica*, invadem as células das plantas por meio de hifas especializadas, enquanto desenvolvem a maior parte do micélio no exterior das células do hospedeiro (Carlile e Watkinson, 1995). Uma hifa que penetra a parede celular, aumenta de volume na extremidade, cessa o crescimento apical e forma um haustório. Esta hifa especializada tem um importante papel na transferência de substâncias entre o hospedeiro e o fungo, nomeadamente aminoácidos, no caso do míldio.

Os haustórios de *P. parasitica* são órgãos especializados constituídos por ramificações de hifas intercelulares, que penetram as células do hospedeiro, variando em tamanho e forma, mesmo nos hospedeiros da mesma espécie botânica (Chu, 1935). Na colza, os haustórios do fungo apresentam uma forma globular ou piriforme (Wang, 1949). Na couve-repolho, alguns haustórios apresentam uma forma bilobada regular, enquanto que outros são vesículas grandes com aspecto irregular, o que contrasta com a couve-flor onde os haustórios são simples, globosos e uniformes em tamanho (Fraymouth, 1956). As variações na forma e no tamanho dessas hifas especializadas dão-se em hospedeiros que não pertencem às *Brassica* spp. como *Capsella bursa-pastoris*, *Cheirantus cheiri*, *Matthiola incana*, *Diplotaxis muralis* e *Rhynchosynapis monensis* (Fraymouth, 1956).

Num extenso estudo com o microscópio electrónico sobre os períodos iniciais de formação do haustório de *P. parasitica* nos cotilédones da couve-repolho, Chou (1970) observou que durante a 1^a fase de iniciação do haustório ocorre um entumescimento localizado da parede celular do hospedeiro nas áreas de contacto

com as hifas. A parte intumescida, com cerca de 1,5-2 μm de comprimento, apresenta uma clara estrutura fibrilar, com uma área parcialmente corroída, sugerindo a existência de degradação da parede. A estrutura fibrilar é possivelmente originada pela remoção enzimática de hidratos de carbono do tipo amorfo, portanto, o enfraquecimento inicial da parede celular do hospedeiro é alcançado em parte por meios químicos (Chou, 1970). A dimensão da região intumescida, coincide de perto com o tamanho do orifício (1-2 μm de diâmetro) feito pelo haustório na parede celular, originando esta mesma parede uma estrutura com a forma de colar à volta da base do primórdio do haustório. Logo que o haustório penetra na célula, começa a ser coberto por uma camada que se molda à sua forma e é produzida pelo protoplasma do hospedeiro, denominada "sheath" e aparentando ser composta por celulose e calose modificadas (Fraymouth, 1956). Chou (1970) apresenta provas sobre uma estrutura morfológicamente análoga que envolve o órgão de alimentação do *P. parasitica*.

A composição e a estrutura da "interface" entre o hospedeiro e o haustório não são conhecidas (Ehrlich e Ehrlich, 1971), nem existem trabalhos recentes sobre o assunto.

A formação do haustório poderá estar intimamente ligada com os processos metabólicos no hospedeiro dependentes do ião Ca^{++} , fornecendo assim novas e interessantes perspectivas na investigação do *P. parasitica* (Yoshida *et al.*, 1993; Yoshida e Ohguchi, 1994).

O efeito dos haustórios nos protoplasmas dos hospedeiros susceptíveis é mais desastroso nas células da epiderme do que nas do mesófilo (Channon, 1981). Nas da epiderme, o citoplasma apresenta-se marcadamente desorganizado, enquanto que nas células do mesófilo, o citoplasma é somente invaginado pelo haustório e o tonoplasto e o plasmalema permanecem inteiros.

2.1.4.5. Efeito do meio no desenvolvimento do fungo *P. parasitica*

Entre os factores que influenciam o míldio das crucíferas destacam-se a temperatura e a humidade. Na fase anterior à penetração, a germinação dos conídios é mais rápida com temperaturas entre 8-12°C, enquanto que a penetração do hospedeiro e a subsequente formação de haustórios são aceleradas respectivamente a 16°C e entre os 20-24°C (Felton e Walker, 1946). A 24°C o crescimento do fungo nos tecidos dá-se muito rapidamente, mas os tecidos também são danificados num curto espaço de tempo, não havendo reinfecção. A 16°C, o crescimento do hospedeiro e do agente patogénico é mais lento, o que eventualmente resulta em danos menores nos tecidos, havendo uma maior esporulação e melhores condições para reinfecções (Felton e Walker, 1946). É então provável que a maior prevalência do

míldio nas brássicas a temperaturas entre 10-15°C resulte da influência favorável do intervalo de temperatura, em contraste com uma rápida invasão pelo agente patogénico e uma consequente destruição auto-inibidora dos tecidos do hospedeiro originado por temperaturas elevadas (Channon, 1981). Outros investigadores têm chegado a intervalos de temperatura semelhantes, nomeadamente 8-16°C (Jonsson, 1966), de 8-14°C (d'Ércole, 1975), embora Nakov (1972) tenha considerado 15-20°C mais favorável ao desenvolvimento do míldio. Contudo, todos estão de acordo em relação à necessidade duma elevada humidade relativa, próxima de 100%, para que se favoreça a progressão da doença.

A esporulação em diversos míldios como o do lúpulo, da cebola, da videira e da alface é inibida pela luz (Yarwood, 1937). O ciclo diurno de esporulação apresentado pelo míldio do lúpulo e da cebola está basicamente dependente de períodos de alternância de luz e escuridão. Em folhas de hospedeiros susceptíveis, a esporulação nocturna está directamente dependente da escuridão e duma alta humidade relativa, o que frequentemente ocorre à noite e de madrugada. Wang (1949), estudando o efeito da luz no desenvolvimento de *P. parasitica* em variedades susceptíveis e resistentes de crucíferas, refere que a luz provavelmente afecta primeiro o hospedeiro e só depois o agente patogénico. A luz de fraca intensidade permite um maior desenvolvimento do micélio do fungo, resultando no aparecimento de numerosas lesões no hospedeiro, que geralmente apresentam muito poucos ou nenhuns sintomas da doença à luz do sol.

Não existe nenhuma relação directa entre a incidência da doença e o excesso ou deficiência de azoto, fósforo, potássio e enxofre em diversas brássicas e crucíferas (Felton e Walker, 1947; Butler e Jones, 1949).

2.1.5. O ciclo de vida

O ciclo de vida do *P. parasitica* não difere muito do de outros fungos da classe *Oomycetes*, pois na fase sexual apresenta uma clara diferenciação entre as estruturas masculina (anterídio) e a feminina (oogónio). Existem três passos chaves, que são universalmente característicos do ciclo de vida de um fungo (Carlile e Watkinson, 1995):

- a) plasmogamia ou fusão celular que ocorre entre duas células haplóides, tipicamente uninucleadas e provenientes de organismos separados que diferem geneticamente. A célula resultante dessa fusão possui dois tipos de núcleos haplóides e denomina-se “dikarion”;
- b) cariogamia ou fusão nuclear que irá dar origem a uma célula com um único núcleo;

c) meiose que restaura o estado haplóide, convertendo uma célula diplóide em quatro células haplóides.

Embora os três passos sejam universais, os organismos diferem muito em relação ao que acontece entre esses passos, resultando uma diversidade de ciclos de vida.

No caso do *P. parasitica* o anterídio e o oogónio são em primeiro lugar multinucleados. A divisão nuclear precede a fertilização e a redução dos cromossomas ocorre no oogónio e no anterídio (Sansome e Sansome, 1974). O único núcleo do gameta funcional não segue imediatamente o processo de fusão, sendo atrasado até que a parede do oósporo esteja em parte formada. O oósporo ao germinar irá dar origem ao micélio que se apresenta no estado diplóide (Webster, 1980).

Williams (1985) apresenta um esquema do ciclo de vida do *P. parasitica* (Figura 2.1). O fungo é um parasita obrigatório produzindo esporos assexuados (conídios) em conidióforos aéreos, que emergem dos estomas do hospedeiro. Os conídios são disseminados pelo vento, chuva ou insectos e, sob condições favoráveis, produzem tubos germinativos que na generalidade penetram directamente na epiderme das folhas. O micélio é não-septado, cenocítico e ramificado e desenvolve-se entre as células do hospedeiro penetrando-as através de haustórios. Os oósporos produzidos nos tecidos necróticos apresentam uma parede externa, “epispore wall”, espessa e lisa, não havendo informação publicada sobre a sua germinação e modo de infecção.

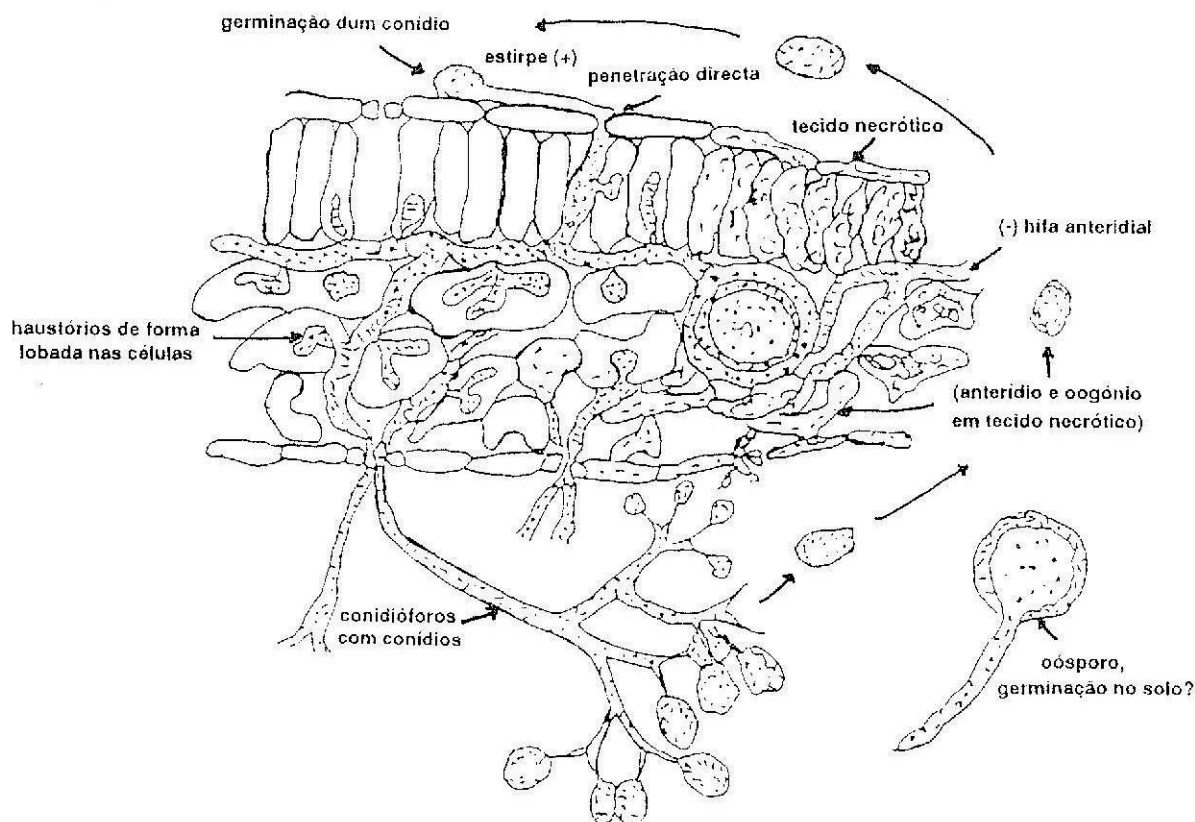


Figura 2.1 - Ciclo de vida do fungo *P. parasitica*. (Adaptado de Williams, 1985)

2.1.6. Especialização fisiológica

A especialização fisiológica do *P. parasitica* foi objecto duma brilhante revisão bibliográfica realizada por Channon (1981), onde se sugere que a especialização parasitária pode ser exibida no hospedeiro ao nível taxonómico do género e da espécie. Diversos investigadores estudaram a especialização parasitária ao nível genérico dos hospedeiros, tendo sido reconhecidas variedades patogénicas ou *formae speciales* do fungo em *Brassica* spp., *Sinapis alba* e *S. alba* e em *Raphanus sativus* e *R. raphanistrum* (Gaumann, 1926), em *Brassica* e *Raphanus* (Hiura e Kanegae, 1934), em *Brassica*, *Raphanus* e *Sinapis* (Dzhanuzakov, 1962) e em espécies de *Brassica*, *Raphanus* e *Capsella* (Wang, 1944; Chang *et al.*, 1964).

Ao nível específico do hospedeiro, Wang (1944) separou o *P. parasitica* var/ f.sp. *brassicae* em seis formas especializadas ao nível de *Brassica* spp. e Chang *et al.* (1964) em três sub-formas: *pekinensis*, *oleracea* e *juncea*.

Outras sub-divisões de certas *formae speciales* podem ser reconhecidas, como na couve-brócolo em que se indica a existência de raças fisiológicas 1 e 2 (Natti *et al.*, 1967).

A inoculação de vários membros da família das crucíferas com isolamentos de *P. parasitica* colhidos em plantas da espécie *Matthiola* mostra que os mesmos isolamentos só são capazes de infectar as espécies de hospedeiros pertencentes aquele género (Jafar, 1963). Da mesma forma, os isolamentos de míldio provenientes de *Brassica oleracea* e *Brassica campestris* estão restritos à gama de hospedeiros das suas espécies de origem (Dzhanuzakov, 1962). Contudo, isolamentos de *P. parasitica* provenientes de *B. oleracea* e *Raphanus sativus*, embora sendo mais virulentos quando inoculados nas suas espécies de origem, também são capazes de infectar outros géneros e espécies da família das crucíferas (McMeekin, 1969; Dickinson e Greenhalgh, 1977). Isolamentos provenientes de *B. oleracea* e *B. napus* são capazes de completar a parte assexuada dos seus ciclos de vida em espécies diferentes dos hospedeiros originais (Kluczewski e Lucas, 1983). A virulência fenotípica dos dois isolamentos nos hospedeiros alternativos é, todavia, consideravelmente diferente:

a) O isolamento proveniente da couve-flor produz alguma esporulação, mas acompanhada de extensas necroses, em espécies de *Brassica* diferentes de *B. oleracea*. Este tipo de reacção é característico duma relação menos compatível entre hospedeiro-agente patogénico, atrasando e reduzindo a esporulação (Greenhalgh e Dickinson, 1975; Kluczewski e Lucas, 1982). O desenvolvimento do fungo nos hospedeiros alternativos pode ser reduzido antes da esporulação se a concentração do inóculo for baixa (Kluczewski, 1981). Como a resistência das plântulas ao míldio aumenta geralmente com a idade do hospedeiro (McMeekin, 1969; Dickinson e Crute, 1981), parece improvável que ocorram significativas infecções cruzadas no campo com este isolamento noutros hospedeiros do género *Brassica* (Kluczewski e Lucas, 1983).

b) O isolamento proveniente de *B. napus* desenvolve-se e produz boa esporulação em muitos hospedeiros da espécie *B. oleracea*, assim como noutras formas cultivadas de *B. napus*. A relativa susceptibilidade da *B. oleracea* aos isolamentos de *B. napus*, não é totalmente inesperada, pois a *B. napus* é um híbrido anfídiploide entre a *B. campestris* e a *B. oleracea* (U, 1935).

Mais recentemente, Sherriff e Lucas (1987) e Sherriff e Lucas (1990) mostraram que os isolamentos dos fungos exibem considerável especialização dentro da família do hospedeiro e, normalmente, só são compatíveis com os genótipos do hospedeiro das espécies de onde foi colhido o isolamento. Não obstante, os isolamentos de *P. parasitica* têm muitas vezes a capacidade de colonizar e causar sintomas em alguns genótipos de diferentes espécies de crucíferas, isto é, espécies diferentes daquelas de onde se obteve o isolamento. Em alguns casos, os isolamentos da mesma espécie do hospedeiro, mas de diferentes origens geográficas, diferem na gama de hospedeiros que podem infectar (Sherriff e Lucas, 1990).

2.2. A doença

2.2.1. Hospedeiros

O mildio das crucíferas causado pelo fungo *P. parasitica* afecta numerosas espécies selvagens e cultivadas da família das crucíferas (Yerkes and Shaw, 1959).

Le Beau (1945) e Moore (1959) assinalam que a doença aparece frequentemente em viveiros, nas plântulas de couve-repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*), couve-de-Bruxelas (*B. oleracea* var. *gemmifera*) e couve-flor (*B. oleracea* var. *botrytis*), causando pesadas perdas. As folhas adultas das referidas brássicas podem também ser atacadas, podendo a doença afectar posteriormente a cabeça - parte comercializável dessas couves (Thung 1926; Ramsey, 1935) e as pré-inflorescências da couve-flor (Jenkins, 1964; Lund e Wyatt, 1978).

A doença afecta as plantas jovens de couve-brócolo (*B. oleracea* var. *italica*) no viveiro causando lesões e conseqüente queda das folhas, mas também no campo onde as plantas infectadas apresentam as inflorescências descoloridas externa e internamente, reduzindo a qualidade e o rendimento da cultura (Natti *et al.*, 1956; Natti, 1958; Davison *et al.*, 1962).

O estudo sobre a resistência ao mildio na couve-tronchuda (*B. oleracea* var. *costata* D.C. sinónimo de *B. oleracea* var. *tronchuda* Bailey), só nos últimos anos tem

sido feito em Portugal por uma equipa de investigadores da Secção de Horticultura do DPAA do Instituto Superior de Agronomia. O míldio nestas couves tem o mesmo comportamento descrito anteriormente em relação às plantas jovens, embora se tenham encontrado alguns ecotipos muito interessantes resistentes à doença, nomeadamente a Couve Algarvia (Monteiro e Williams, 1989; Dias *et al.*, 1992; Sousa *et al.*, 1994; Carvalho, 1995).

Outras culturas hortícolas podem ser atacadas, nomeadamente o rabanete (*Raphanus sativus*), o rábano bravo (*Armoracia rusticana*), “stock” (*Matthiola incana*), o agrião (*Nasturtium officinale*), “wallflower” (*Cheirantus cheiri*) e “aubretia” (*Aubretia* sp.) (Moore, 1959). A couve-chinesa (*B. campestris* subsp. *pekinensis*) é uma cultura hortícola que pode ser severamente atacada pelo *P. parasitica* (Ikata, 1930; Chang *et al.* 1963).

O míldio é comum noutras brássicas como a couve-rábano (*B. oleracea* var. *gongylodes*), o nabo (*B. campestris* var. *rapifera*), na “Kale” (*B. oleracea* var. *acephala*), a “kale” chinesa (*B. oleracea* var. *albogabra*), a colza (*B. napus* var. *oleifera*) (Moore, 1959; Johnston, 1963; Anón., 1968); *B. fruticulosa*, *B. tournefortii*, *B. juncea* e *B. nigra* (Gaumann, 1926) e na *B. chinensis* (Hiura e Kanegae, 1934). Outras espécies que podem ser atacadas pela *P. parasitica* são a *Camelina sativa* (Darpoux, 1945), *Cheirantus allioni* (De Bruyn, 1935), *Coronopus didymus* (Langdon, 1948), *Coronopus squamatus* (Dias e Da Câmara, 1953), *Eruca sativa*, *Raphanus raphanistrum*, *Sinapsis alba*, *S. arvensis* (Gaumann, 1926), *Lepidium gaminifolium* (Nicolas e Aggéry, 1940), *Malcolmia africana* (Thind, 1942). Somando às espécies citadas, Gaumann (1923) publicou uma lista de mais de 80 espécies de crucíferas susceptíveis ao míldio.

A *Arabidopsis thaliana* é também hospedeiro de *P. parasitica* (Lindau, 1901) e tem sido, em anos mais recentes, objecto de aturado estudo por parte de cientistas, pois tornou-se um modelo de planta para estudos biológicos de genética molecular (Koch e Slusarenko, 1990). A interacção diferencial dum isolamento de *P. parasitica* com duas estirpes de *Arabidopsis*, abriu a possibilidade de estudos de clonagem das causas de resistência à doença num hospedeiro que é muito propício à análise genética e molecular, por apresentar um genoma reduzido, a quase ausência de “interspersed repetitive DNA” e a disponibilidade de mapas genéticos paralelos de genes marcadores e fragmentos de DNA (Chang *et al.*, 1988; Nam *et al.*, 1989).

2.2.2. Distribuição geográfica

O míldio que afecta as brássicas cultivadas e outras espécies da família das crucíferas distribui-se geograficamente pelo mundo inteiro englobando países dos cinco continentes (Channon, 1981). Embora esta lista não seja exaustiva, inclui

referências a investigadores portugueses que trabalharam nas ex-colónias como Angola (Serafim e Serafim, 1968) e Moçambique (DeCarvalho 1948). Assinale-se também a identificação do míldio em Portugal por Da Costa e Da Câmara (1954).

2.2.3. Ciclo da doença

O ciclo do míldio, causado pelo agente patogénico *P. parasitica*, não tem sido objecto de estudo tão aturado como o que acontece com outro dos membros da família das Peronosporáceas, o míldio da videira, causado pelo fungo *Plasmopara viticola*, que aparece em qualquer livro texto de patologia vegetal, talvez pela importância económica que a videira tinha e tem em muitos países .

Williams (1985), propõe um ciclo para o míldio (Figura 2.2).

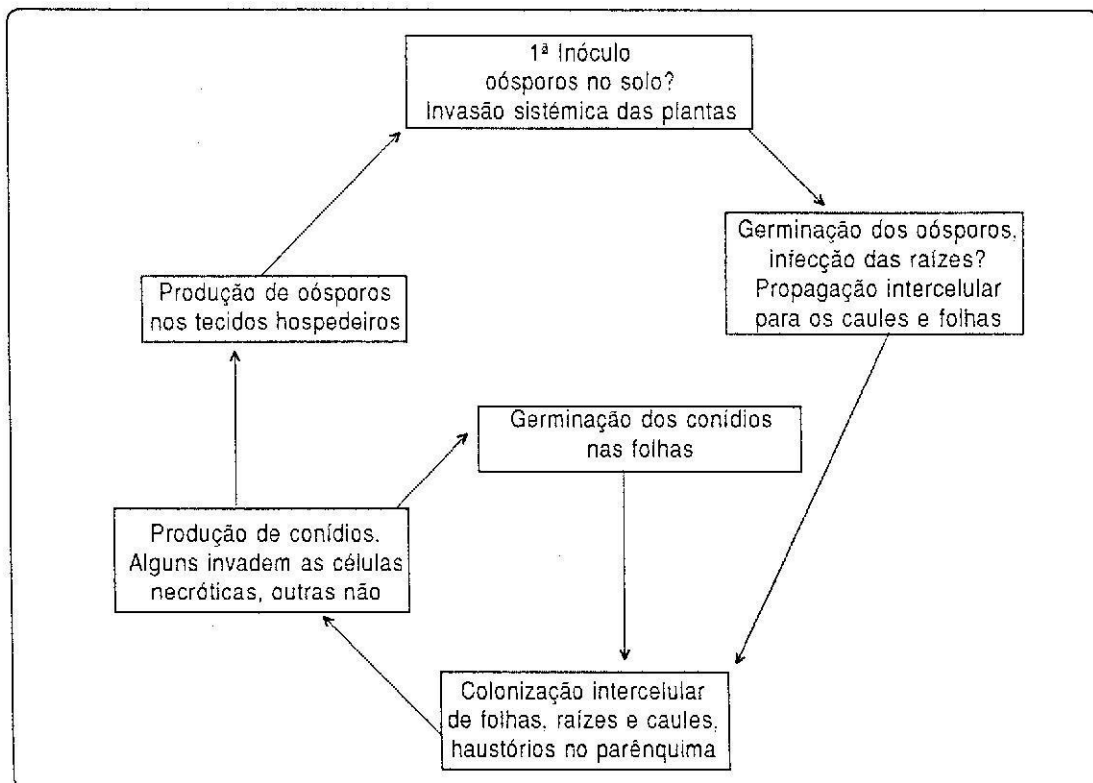


Figura 2.2 - Ciclo da doença do míldio. (Adaptado de Williams, 1985)

O esquema contém duas interrogações que até à data não foram respondidas (Figura 2.2). A primeira se o 1º inóculo é constituído por ósporos. A segunda se os ósporos têm a capacidade de germinar no solo infectando em seguida as raízes.

Seguindo o ciclo proposto por Williams (1985), fica-se com curiosidade sobre o ciclo do *P. parasitica* em Portugal, pois os esporos de resistência (ósporos) que provavelmente existem no solo, não passam o Inverno mas sim o Verão na maioria

das zonas onde são cultivadas as brássicas. Para além disso, existem brássicas cultivadas durante todo o ano, sugerindo a existência de inóculo assexuado (conídios), para contínuas infecções em hospedeiros susceptíveis.

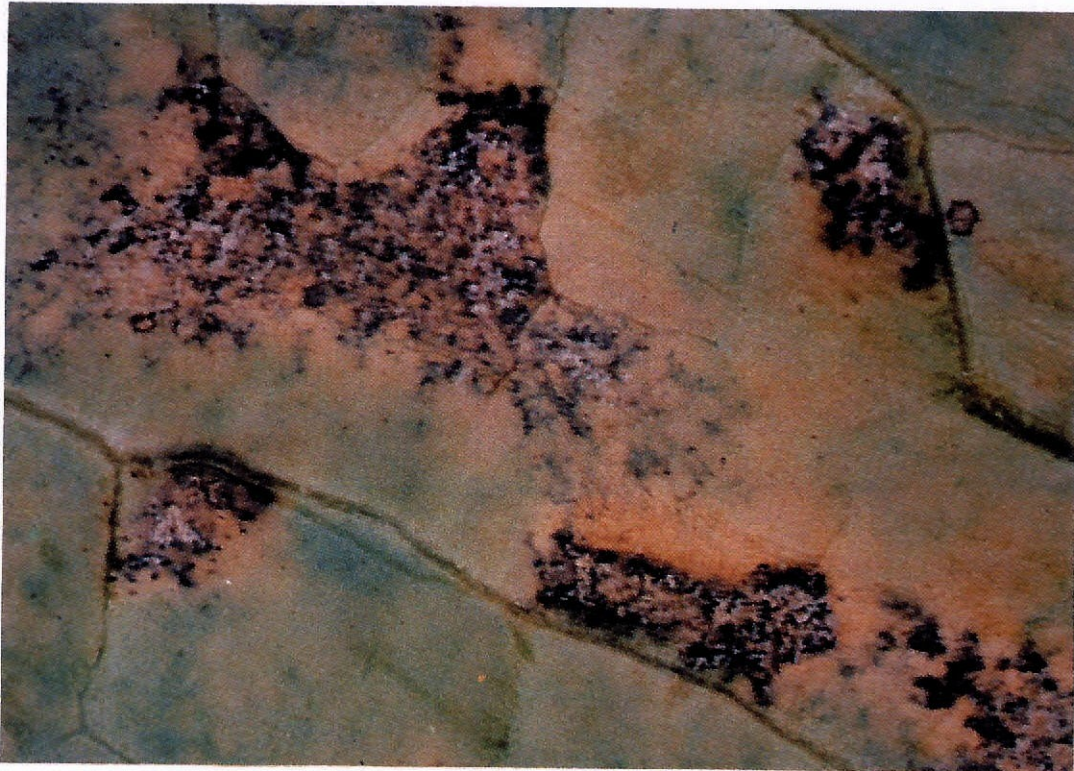
2.2.4. Sintomas

Nos viveiros, quando as plantas estão na fase cotiledonar, o ataque do fungo *P. parasitica* em brássicas susceptíveis inicia-se por pontos ou pequenas manchas descoloridas na superfície dos cotilédones, que podem amarelecer e mais tarde murchar e morrer, sendo certo que a perda de cotilédones nesta fase é fatal para a planta (Channon, 1981). Antes das plântulas morrerem, o fungo esporula formando um manto esbranquiçado, fino, solto e denso ou espalhado em tufo de conidióforos e conídios, principalmente na parte abaxial dos cotilédones e também no hipocótilo (Channon, 1981; Williams, 1985).

Os sintomas mais característicos nas plantas adultas susceptíveis ao míldio, são as manchas amarelo-acastanhadas de forma irregular que se desenvolvem nas folhas. Quando as condições climáticas são favoráveis, temperatura fresca e muita humidade, os órgãos de frutificação de aspecto branco-acinzentado desenvolvem-se nas páginas inferiores, correspondendo às manchas cloróticas ou parcialmente necróticas da parte adaxial das folhas (Figura 2.3), (Channon, 1981; University of California, 1994).

O míldio pode, nos casos da couve-flor e do brócolo, tanto no campo como em armazém, espalhar-se internamente às pré-inflorescências, às inflorescências e suas hastes, apresentando manchas acinzentadas nas “cabeças” que baixam a qualidade comercial da couve-flor (Figura 2.4). As lesões podem agravar-se com o aparecimento de manchas castanho escuro, que podem chegar a inibir a produção de flores no caso das culturas destinadas à produção de semente. (Chorin, 1946; Natti *et al.*, 1956; Davison *et al.*, 1962; Jenkins, 1964; Lund e Wyatt, 1978; University of California, 1994). No brócolo as inflorescências e as respectivas hastes infectadas pelo míldio apresentam-se escurecidas ou com faixas negras. Assim como na couve-flor, as lesões causadas podem ser invadidas por bactérias e outros organismos secundários dando origem à destruição das partes afectadas (University of California, 1994).

As couves-repolho podem ser infectadas no campo ou quando estão armazenadas (Thung, 1926; Ramsey, 1935). Os sintomas são característicos, consistindo numa extensa descoloração preto-acinzentada que se espalha nas cabeças chegando mesmo a penetrar no parênquima do caule. Após o ataque do míldio, os tecidos são muito susceptíveis ao ataque de bactérias e fungos secundários como os dos géneros *Erwinia*, *Alternaria* e *Rhizopus*.



2.3 - Quando as condições do meio são favoráveis, o fungo *P. parasitica* desenvolve-se e esporula nas lesões da parte abaxial da folha. (Adaptado de University of California, 1994)



Figura 2.4 - Ataque de *P. parasitica* a cabeças de couve-flor, produzindo manchas negro-violáceas debaixo do tecido cortical. (Adaptado de University of California, 1994)

O míldio causado pelo fungo *P. parasitica* é uma doença muito comum nas brássicas cultivadas que predomina na época fria e húmida do ano (Channon, 1981). Contudo, Monteiro (comunicação pessoal) tem constatado que a doença em Portugal é sobretudo perigosa quando a temperatura do ar é superior a 20°C. Os estragos causados às culturas accentuam-se quando as plantas estão no viveiro ainda no estado cotiledonar, pois o ataque do fungo dá origem à morte dum grande número delas (Channon 1981, McMaugh 1986, Smith *et al.* 1988; University of California 1992). No caso de plantas mais velhas, existe uma relação mais equilibrada entre o hospedeiro e o parasita, sendo o efeito do fungo menos debilitante para o hospedeiro, reduzindo unicamente a qualidade e o rendimento das culturas (Channon, 1981).

**Aspectos
macroscópicos e
microscópicos do
Peronospora parasitica
(Pers. ex Fr.) Fr. em
Portugal**

3 - ASPECTOS MACROSCÓPICOS E MICROSCÓPICOS DO *PERONOSPORA PARASITICA* (Pers. ex Fr.) Fr. EM PORTUGAL

3.1. Introdução

A cultura das couves tronchudas espalha-se de norte a sul de Portugal, sendo possível encontrar diferentes ecotipos segundo as regiões onde é cultivada, diferindo na adaptação ecológica, ciclo vegetativo e caracteres morfológicos (Dias, 1992).

As diversas variedades de *B. oleracea* fazem parte integrante do sistema de horticultura predominante em Portugal. Atendendo ao clima favorável, é evidente que o míldio esteja presente e seja uma das doenças que mais afecta quantitativa e qualitativamente a cultura, em especial nos viveiros mas também ao ar livre.

Em Portugal, Câmara (1946) foi o primeiro investigador a identificar o *P. parasitica* em folhas de *B. oleracea*, no Alto Alentejo, Vila Viçosa. A partir de 1945, o fungo foi identificado por vários autores em diversas variedades da espécie *B. oleracea*, assim como noutros hospedeiros da família das crucíferas, nomeadamente *Coronopus squamatus*, *Capsella bursa-pastoris* e *Nasturtium officinalis* (Lucas e Dias, 1976).

Exceptuando esses trabalhos de identificação, muito pouco se tem publicado sobre este fungo em Portugal. Recentemente foram realizados estudos sobre a resistência das couves galaico-portuguesas ao *P. parasitica*, em que se identificam algumas variedades primárias com interesse para melhoramento da resistência ao míldio (Monteiro e Williams, 1989; Dias *et al.*, 1993; Sousa *et al.*, 1994; Carvalho, 1995), mas onde o agente patogénico não é estudado.

Com o objectivo de conhecer melhor o agente patogénico causador do míldio das brássicas, apresenta-se neste capítulo um trabalho de identificação com o auxílio de fotografias. Os diversos aspectos macroscópicos e microscópicos que foram objecto de discussão no capítulo 2 são mostrados, assim como, alguns pormenores que pela primeira vez foram encontrados no *P. parasitica*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. Origem geográfica dos isolamentos

Um total de 15 isolamentos de *P. parasitica* foram utilizados, sendo três deles (P501, P502, P506) provenientes dos estudos de Sousa *et al.* (1994) sobre resistência e susceptibilidade das couves tronchudas e galegas ao míldio e os restantes colhidos especialmente para o presente trabalho. A colheita dos 13 isolamentos efectuou-se de Janeiro a Março de 1994 e 1995 em folhas de *Brassica oleracea* que apresentavam sintomas típicos da doença e às vezes sinais do agente patogénico. Os hospedeiros foram na sua maioria couves tronchudas (*B. oleracea* var. *costata*), excepto no isolamento proveniente de Oliveira do Hospital, que foi a couve galega (*B. oleracea* var. *acephala*) e dum dos isolamentos da Batalha, que foi retirado duma mistura de folhas de brócolo, couve flor e couve tronchuda (Quadro 3.1.).

Sendo as couves em geral cultivadas em todo o território continental, o material vegetal infectado foi recolhido em zonas onde a produção hortícola de brássicas tem maior peso económico, como a zona do Oeste, assim como em locais espalhados de Norte a Sul do País, procurando diferenças climáticas evidentes (Figura 3.1).

Quadro 3.1 - Hospedeiros e origem geográfica dos isolamentos

Isolamentos	Hospedeiro	Origem Geográfica
P 501	couve-tronchuda	Batalha
P 502	couve-tronchuda	Póvoa
P 503	couve-galega	O. Hospital
P 504	couve-tronchuda	C. Branco
P 505	couve-tronchuda	Évora
P 506	couve-tronchuda	Odemira
P 507	couve-tronchuda	Batalha
P 508	couve-tronchuda	Condeixa
P 509	couve-tronchuda	Vila Real
P 510	couve-tronchuda	Faro
P 511	couve-tronchuda	Lourinhã
P 512	brócolo + couve-flor + couve-tronchuda	Batalha
P 513	couve-tronchuda	Pombal
P 514	couve-tronchuda	Condeixa
P 515	couve-tronchuda	Condeixa

3.2.2. Obtenção dos isolamentos

3.2.2.1. Colheita

As folhas infectadas foram colhidas para dentro dum saco de plástico, borrifadas com água e transportadas para o laboratório, onde foram postas numa câmara escura a 16°C, por um período de 24 horas, com o objectivo de promover a esporulação. Procedeu-se à escolha de uma ou várias folhas com lesões que apresentassem boa esporulação, que foi confirmada por observação com uma lupa (Wild M3c) e a ampliação de 25x. As lesões foram repetidamente lavadas com jactos de água destilada para dentro dum frasco "Schott" (100 ml), com o objectivo de colher a maior quantidade de conídios. Para além disso, procedeu-se ao corte da folha em pequenas secções contendo lesões e introduziram-se no frasco. Adicionou-se água

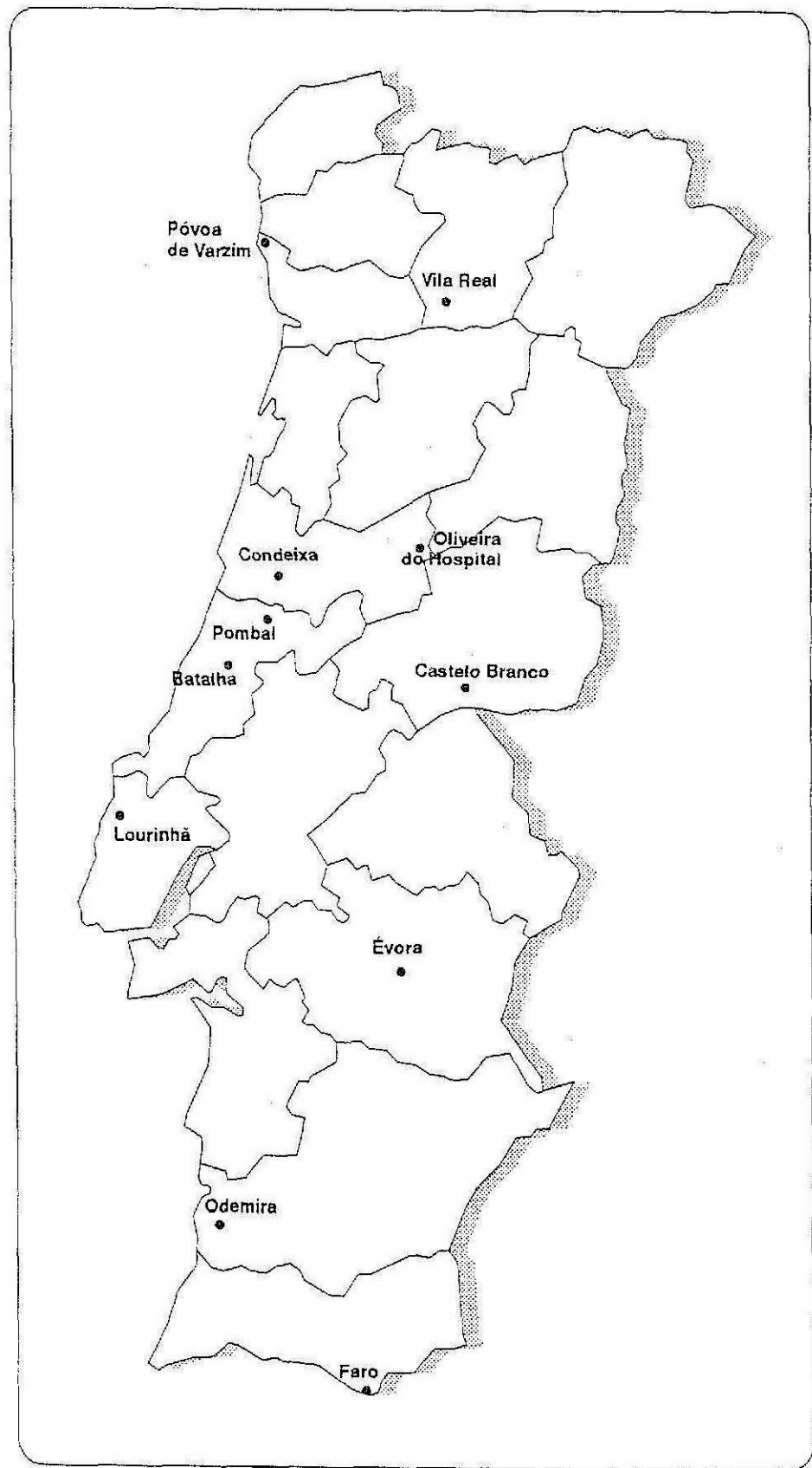


Figura 3.1 - Locais do território continental onde os isolamentos foram recolhidos.

destilada até ao volume de 50 ml, agitou-se por cerca de 10 segundos num agitador tipo vórtex. Quantificou-se o inóculo utilizando um hemocitómetro e ajustou-se a concentração de esporos a 5×10^4 .ml⁻¹. Procedeu-se, em seguida, à inoculação de hospedeiros susceptíveis mantidos em vasos de 6 cm de diâmetro, colocando duas gotas de inóculo de 10 µl sobre cada cotilédone.

3.2.2.2. Manutenção

Uma semana antes da colheita dos isolamentos, tinha sido iniciado o processo de preparação dos hospedeiros susceptíveis para a manutenção do fungo. Utilizou-se a população de CrGC 3.4 (Crucifer Genetics Cooperative 3.4, Williams, 1985), constituída por plantas de crescimento rápido da espécie *B. oleracea*, com alta susceptibilidade ao míldio, tendo as sementes sido obtidas e testadas na Secção de Horticultura do D.P.A.A. do I.S.A..

Semearam-se, em três ou quatro vasos (6cm de diâmetro) previamente cheios com turfa de estrutura fina "Levington F2", com pH neutro e nível médio de nutrientes, trinta a quarenta sementes de CrGC 3.4. As sementes foram depois cobertas com vermiculite, regadas e os vasos postos num propagador fechado e levados para a câmara de crescimento. Após cinco dias, as plantas apresentavam cotilédones prontos para inoculação, que foi realizada utilizando os isolamentos provenientes do campo seguindo o método acima descrito.

Os vasos com as plantas inoculadas foram depois colocados num propagador fechado (Mini-estufa Ubbink, 38cm x 24cm x 19cm) levados para incubação em câmara escura a 16°C por um período de 24 horas, após o que foram colocados, por cinco dias numa câmara de crescimento a 20 +/-1°C; fotoperíodo de 24h, sob intensidade média de luz de 300 µmol m⁻² s⁻¹ e 80-90% de humidade. As regas foram efectuadas diariamente por capilaridade, deitando água directamente no tabuleiro que suportava os vasos.

Ao fim dos cinco dias, retirou-se o propagador da câmara de crescimento e colocou-se novamente na câmara escura, a 16°C durante 24 horas, para esporulação, após o que se colheram os cotilédones esporulados e se fizeram uma ou duas subculturas para cada um dos isolamentos, para remover eventuais contaminações de *Alternaria* spp., que possui um ciclo de esporulação mais lento (Sherriff e Lucas, 1990).

A manutenção dos isolamentos de *P. parasitica* teve como base métodos similares aos utilizados por Williams (1985), Sherriff e Lucas (1989; 1990), Moss *et al.* (1994) e Carvalho (1995).

Os cotilédones esporulados, provenientes das subculturas dos isolamentos colhidos no campo, isentos de *Alternaria* spp., foram colhidos com uma pinça

esterilizada com álcool e postos num frasco de "Schott", contendo cerca de 50 ml de água destilada. Em seguida, o frasco foi agitado por 10 segundos para que os conídios se soltassem dos conidióforos. A suspensão de esporos foi filtrada para eliminar os tecidos vegetais, com três camadas de gaze e centrifugada durante 3 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi retirado e, ao precipitado de conídios juntou-se novamente água destilada, obtendo uma nova suspensão que foi centrifugada novamente. Finalmente, ao novo precipitado adicionou-se água destilada cujo volume era conhecido e fez-se a contagem do número de esporos, utilizando um microscópio óptico (Nikon Optiphot - 2) e um hemocitómetro, ajustando a concentração de esporos a $5 \times 10^4 \text{ .ml}^{-1}$, procedendo-se de imediato à inoculação de cotilédones de plantas susceptíveis.

3.2.2.3. Conservação

Parte dos cotilédones que apresentavam esporulação foram postos em caixas de Petri (6 cm de diâmetro), seladas com "Parafilm" e colocadas numa arca congeladora a -30°C , conseguindo-se assim inóculo viável por um período de 5 a 6 meses.

Quando houve necessidade de recuperar os esporos, retirou-se o material do congelador e transferiram-se os cotilédones congelados directamente para um frasco "Scotch" com 50-100 ml de água destilada. Agitou-se o frasco tapado por um período de 10 segundos e em seguida encheram-se dois tubos de centrífuga com o material proveniente do frasco e centrifugou-se a 2000 rpm por 3 minutos. Retiraram-se os tubos da centrífuga, eliminou-se o sobrenadante e fizeram-se novas suspensões, adicionando água destilada e agitando os tubos por alguns segundos. Transferiu-se o material dos dois tubos para um novo tubo, agitou-se novamente e retirou-se uma pequena amostra de 1 ou 2 microlitros com uma micropipeta e fez-se a contagem do número de esporos num hemocitómetro. Ajustou-se a concentração de esporos para $5 \times 10^4 \text{ .ml}^{-1}$ e inocularam-se com uma pipeta de "Eppendorf" os cotilédones de plantas de CrGC 3.4 semeadas em 2 ou 3 pequenos vasos, 5-7 dias antes. Os vasos foram colocados num propagador devidamente selado com parafilme, seguindo-se depois o método descrito anteriormente para a incubação e obtenção de esporulação do míldio.

3.2.3. Preparação do material para registos fotográficos

Dez cotilédones de cada um dos quinze isolamentos apresentando esporulação foram colhidos, postos em caixas de Petri e devidamente seladas com "Parafilm". Em seguida, foram transportados para a Escola Superior Agrária (E.S.A.) de Castelo Branco, onde se procedeu à preparação do material para os respectivos registos fotográficos. Optou-se por trabalhar cada semana, somente com quatro isolamentos, por questões de disponibilidade de tempo, material de laboratório e fotográfico.

Nos laboratórios da E.S.A., procedeu-se à preparação de cada um dos isolamentos de *P. parasitica* para análise e registo fotográfico, utilizando técnicas simples de patologia vegetal:

- 1) Retirou-se com uma pinça devidamente desinfectada com álcool um cotilédone da caixa de Petri para a bancada.

- 2) Numa lâmina de vidro foi colocada uma gota de lactofenol ou azul de algodão.

- 3) Com uma tira de fita adesiva (1,5 x 7 cm) pressionou-se levemente sobre o cotilédone de maneira a que os conidióforos e conídios viessem agarrados à fita.

- 4) Finalmente, colocou-se sobre a lâmina de vidro a tira de fita adesiva. A lâmina de vidro foi analisada ao microscópio óptico "Leitz" com ampliações de 100x e 400x, sendo a última a mais utilizada. Procurou-se encontrar aspectos representativos da morfologia do fungo, assim como formas invulgares de conidióforos e conídios. Procedeu-se ao registo fotográfico com um aparelho "Wild Photoautomat MPS45" com um coeficiente de redução de 0,32, próprio para este tipo de trabalho.

Os aspectos macroscópicos do fungo foram observados directamente com uma lupa "Wild M3B", com ampliações de 16x e 40x, na caixa de Petri que continha os cotilédones infectados. Registou-se fotograficamente o material com o aparelho anteriormente citado. Para a obtenção de fotografias de haustórios, foram aplicadas outras técnicas de preparação adequadas, em virtude desses órgãos de alimentação do fungo se apresentarem dentro do próprio hospedeiro. A descrição dessas técnicas será apresentada no parágrafo 4.2., onde se procede à descrição do material e métodos do estudo efectuado sobre homotalismo e heterotalismo dos isolamentos portugueses.

3.3. Resultados e discussão

3.3.1. Descrição geral

O fungo *P. parasitica*, causador do míldio das crucíferas, apresenta como Williams (1985) descreve, um manto de conidióforos de cor esbranquiçada, finamente denso ou disperso em tufo na parte abaxial dos cotilédones. Os quinze isolamentos observados apresentaram essas características (Figura 3.2), e em virtude de terem sido utilizados hospedeiros muito susceptíveis (CrGC 3.4), os cotilédones apresentaram também esporulação na parte adaxial, mostrando total compatibilidade entre hospedeiro e parasita (Figura 3.3).



Figura 3.2 - Cotilédone de CrGC 3.4 apresentando um manto de conidióforos na sua parte abaxial. (Ampl. 4x).



Figura 3.3 - Cotilédones de CrGC 3.4 com as partes adaxiais completamente colonizadas com *P. parasítica*. (Ampl. 4x).

Nas Figuras 3.4 e 3.5 pode-se apreciar melhor um cotilédone de CrGC 3.4., com a página inferior completamente colonizada pelo fungo. O aspecto é esbranquiçado granuliforme quando visto à lupa a 16x, enquanto que se notam perfeitamente os tufos de conidióforos e conídios quando a ampliação é de 40x. Um pormenor de um conidióforo e respectivos conídios emergindo sozinho do cotilédone é apresentado na Figura 3.6.

No aspecto microscópico, os isolamentos analisados mostraram possuir micélio cenocítico, hialino, ramificado nos espaços intercelulares e enchendo completamente os espaços intercelulares, com haustórios de aspecto globular a lobulado dentro das células dos tecidos (Figuras 3.7, 3.8), chegando mesmo a formar dois haustórios na mesma célula (Figura 3.9). As ligações dos haustórios com o micélio são feitas por estreitos pedúnculos de cerca de 2 μ m de diâmetro (Davison, 1968a), o que se pode constatar nas figuras apresentadas. Na Figura 3.7 deparamos com um haustório completamente rodeado por uma membrana (sheath) semelhante às descritas por Mangin (1895), Fraymouth (1956), Davison (1968a) e Chou (1970).

Os conidióforos podem emergir sozinhos ou em grupos dos estomas (Webster, 1980; Williams, 1985). Quando observados ao microscópio, os quinze isolamentos exibiam um eixo principal que se ramificava dicotomicamente em ângulos agudos (Figura 3.10) suportando conídios de forma circular ou oval nas extremidades encurvadas dos ramos (Figura 3.11 e 3.12).

Encontraram-se, em todos os isolamentos analisados, formas esféricas, ovais (Figura 3.13) e elípticas (Figura 3.14), com predominância para as últimas e confirmou-se um aspecto característico do *P. parasitica*, a germinação através de tubo germinativo (Figura 3.15).

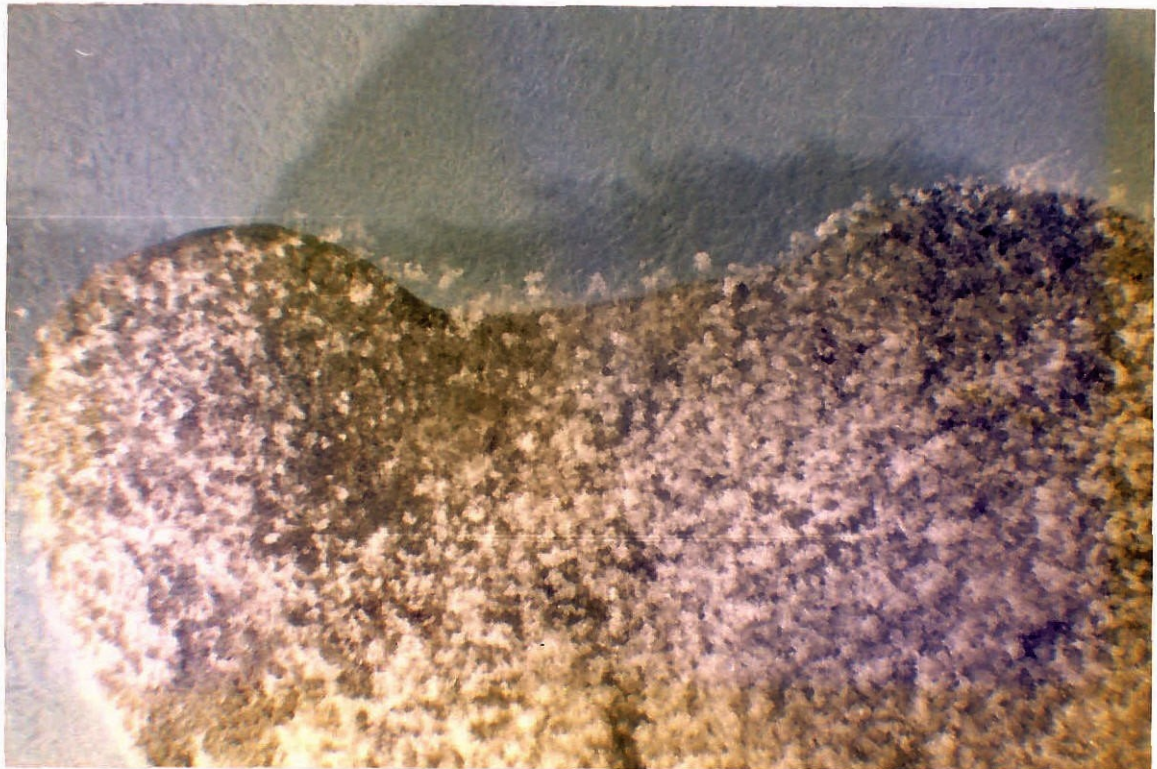


Figura 3.4 - Página inferior de um cotilédone de CrGC 3.4 coberto com um manto de conidióforos e conídios. (Ampli. 21x).

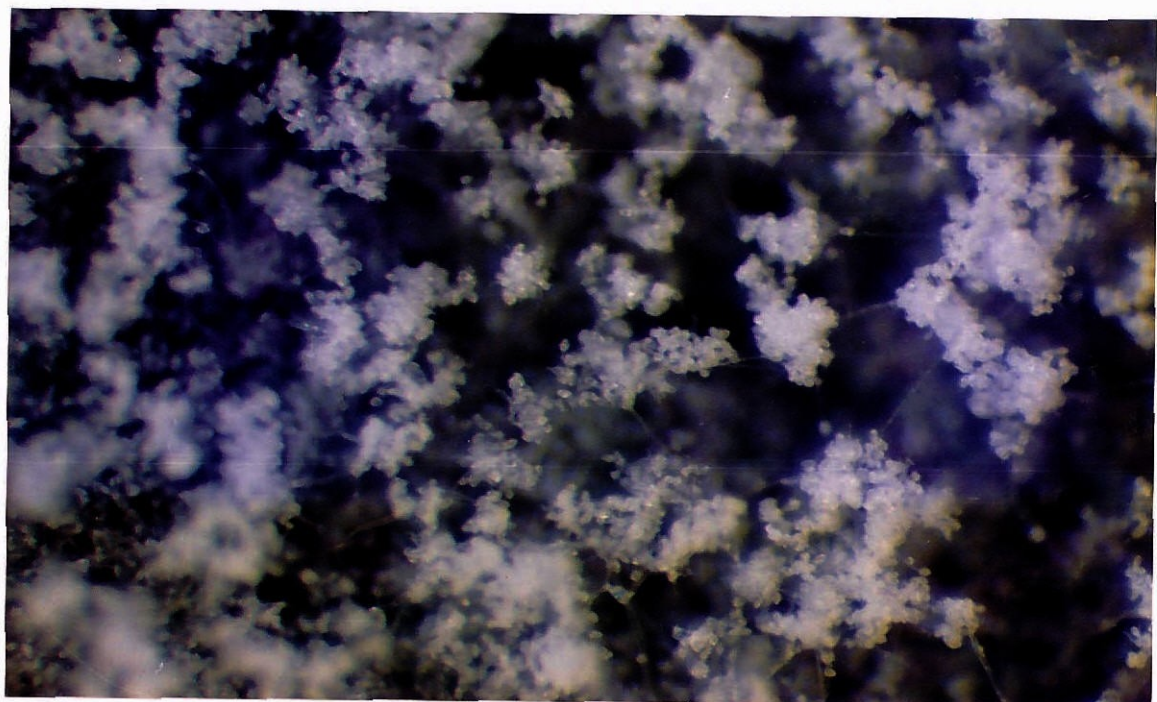


Figura 3.5 - Aspecto do mesmo cotilédone de CrGC 3.4 da Figura 3.4. (Ampli. 53x).



Figura 3.6 - Aspecto de um conidióforo e conídios de *P. parasitica* emergindo dum cotilédone de *Brassica oleracea*. (Ampl. 53x).

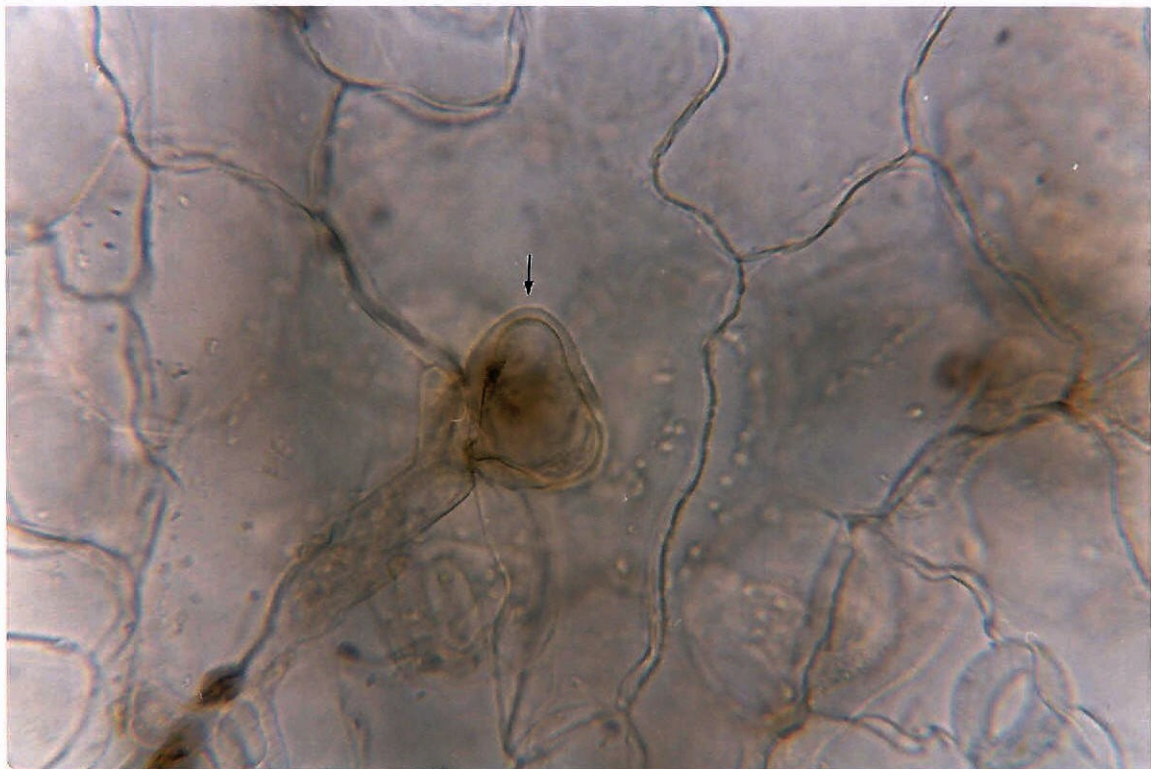


Figura 3.7 - Haustório de forma lobular envolvido completamente pela membrana (sheath). Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).

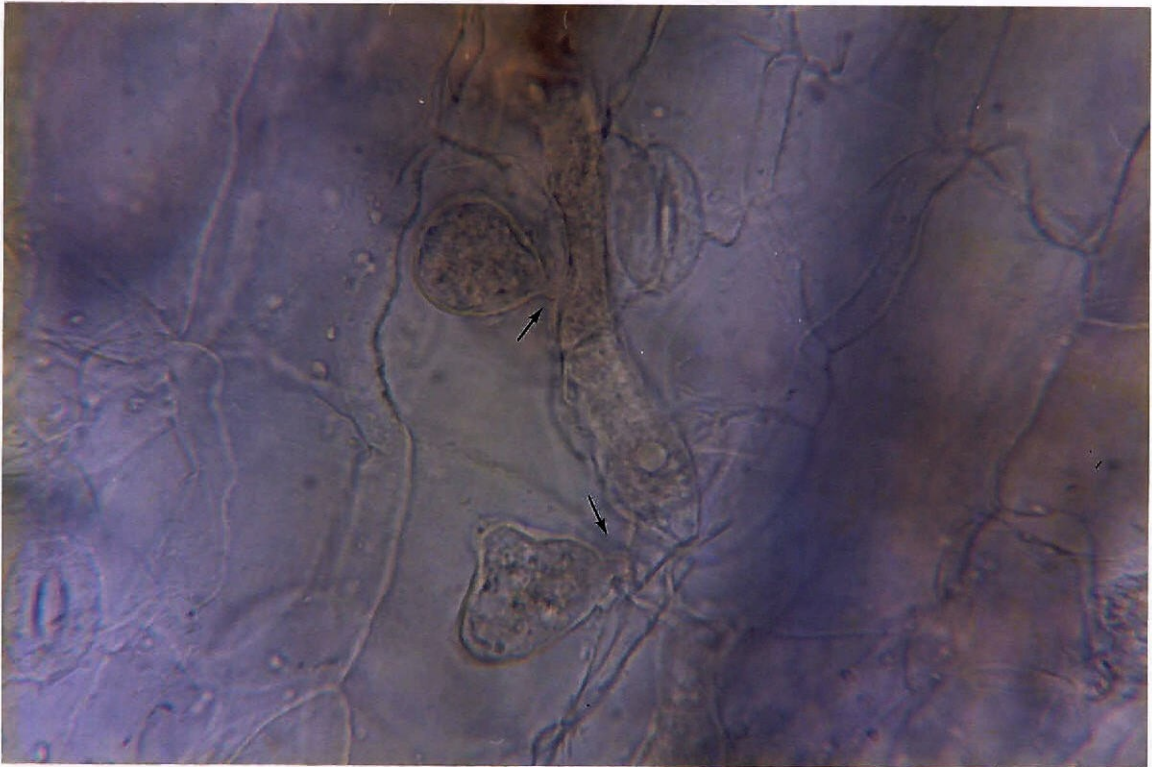


Figura 3. 8 - Pormenor de dois haustórios de forma globular, notando-se os estreitos e pequenos pedúnculos de ligação com o micélio intercelular. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).



Figura 3. 9 - Aspecto curioso de dois haustórios de *P. parasitica* na mesma célula do hospedeiro. Preparação corada com lactofenol. (Ampl. 534x).

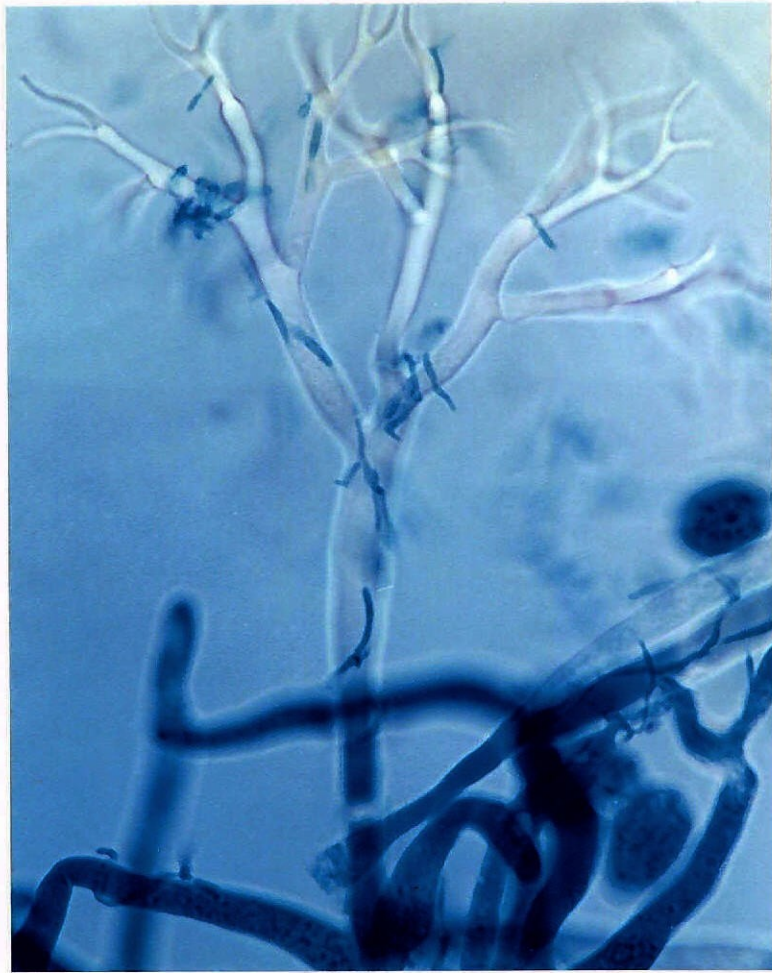


Figura 3. 10 - Típico conidióforo de *P. parasitica* com o eixo principal ramificado dicotomicamente em ângulos agudos. Preparação corada com azul de algodão. (Ampl. 534x).



Figura 3. 11 - Conidióforo e conídios de *P. parasitica* observados em cotilédones de CrGC 3.4. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).



Figura 3. 12 - Típico conidióforo de *P. parasitica* com a maior parte dos conídios nos esterigmas. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).

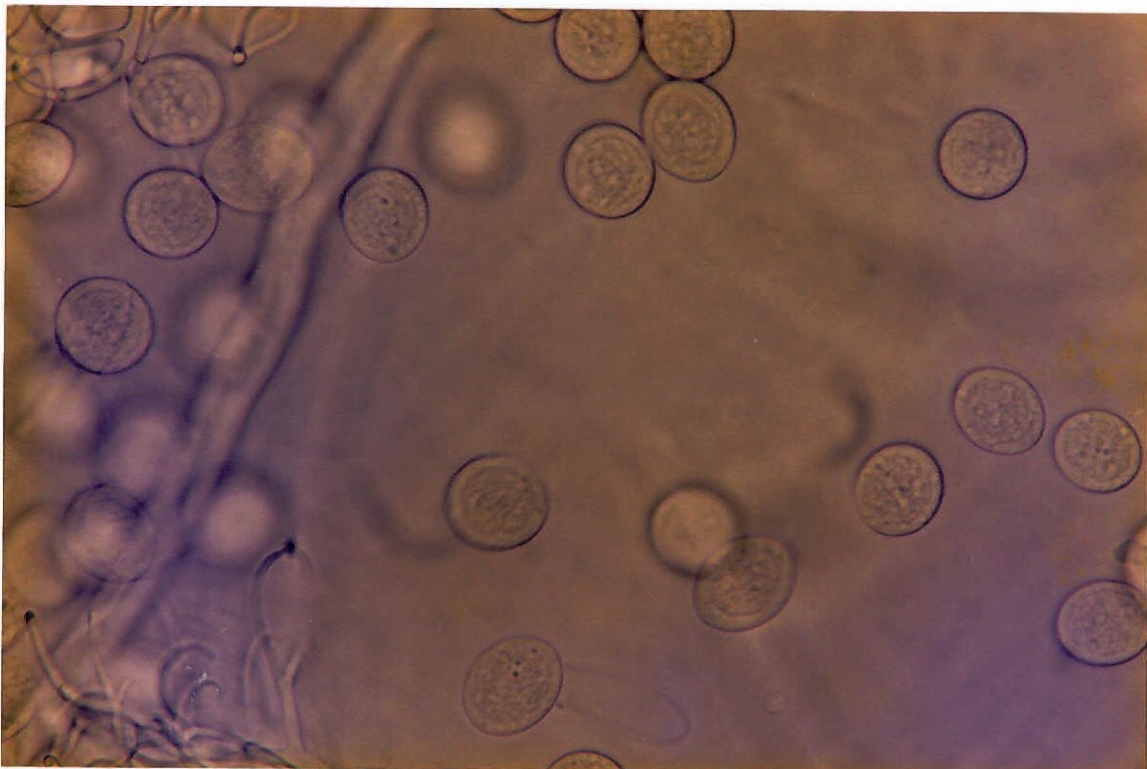


Figura 3. 13 - Aspecto de conídios de *P. parasitica* com formas circulares e ovais. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).



Figura 3. 14 - Aspecto de conídios de *P. parasitica* de forma elipsoidal. Preparação corada com lactofenol. (Ampli. 534x).



Figura 3. 15 - Pormenor de um conídio de *P. parasitica* germinando por tubo germinativo. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).

3.3.2. Aspectos particulares

Ao se analisarem os isolamentos P506 (Odemira), P507 (Batalha), P509 (Vila Real) e P511 (Lourinhã) surgiram alguns aspectos interessantes:

a) Alguns conídios exibiam formas semelhantes a "sapatos" ou "garrafas" (Figuras 3.16 e 3.17), além de apresentarem formas normais circulares, ovais e elípticas. À primeira vista, parecia que os conídios se preparavam para germinar, mas ao comparar com a Figura 3.15, observa-se que os conídios com a forma invulgar não apresentam tubos germinativos. Um pormenor dum desses conídios ainda agarrado a um ramo dum conidióforo, é apresentado nas Figuras 3.18 e 3.19. É nítido o contraste entre um conídio de forma oval normal e um de forma invulgar.

b) O aspecto geral das ramificações primárias e secundárias dos conidióforos é semelhante ao do *P. parasitica*, mas os esterigmas que suportam os conídios terminais são mais longos e mais encurvados (Figuras 3.20, 3.21 e 3.22). Nas mesmas figuras pode-se apreciar a ausência de septos. Um pormenor interessante é a diminuta absorção do azul de algodão por parte do citoplasma do conidióforo e dos conídios (Figuras 3.20, 3.23 e 3.25).

c) Os conídios que estão ligados aos esterigmas são alongados, passando parte do citoplasma para a parte terminal mais arredondada, adquirindo formas em "sapato" ou em "garrafa" (Figuras 3.23 e 3.24). Há um maior crescimento e conseqüente alongamento dos conídios, tomando formas muito esquisitas que são anormais no fungo *P. parasitica*.

Em certos conídios, a partir da parte terminal mais arredondada, dá-se uma bifurcação e aparecem dois ramos que exibem depois longos esterigmas com os mesmos conídios de formas invulgares (Figura 3.26).

O esporos anormais não foram observados nos outros 11 isolamentos.

Realizou-se uma aturada pesquisa bibliográfica no intuito de se conseguir uma explicação plausível para a diversidade morfológica exibida pelo material proveniente de Odemira, Batalha, Vila Real e Lourinhã. Tanto quanto se sabe, não existe até agora nenhum artigo publicado sobre *P. parasitica* que explique o que foi descrito anteriormente.

Crute (comunicação pessoal) aventa as seguintes hipóteses: a) os conídios de forma anormal assemelham-se aos do género *Phytophora*, podendo então ser uma contaminação por fungos deste género, o que seria a primeira vez que isso acontecia em brássicas; b) uma contaminação por fungos do género *Phytium*; c) uma mutação do fungo *P. parasitica*. O mesmo investigador sugeriu que seria interessante investigar estas hipóteses, já que no que diz respeito a mutantes, foi encontrado no "Horticultural Research International" (HRI), em Wellesbourne, Inglaterra, um mutante do *P. parasitica* que apresentava duas grandes bolsas de lípidos, em vez de

várias delas como é normal, sendo estas bolsas uma fonte de energia para os esporos.

Embora duvide que as contaminações sejam de fungos do género *Phytophthora* ou *Phytium*, porque as condições ambientais para a germinação, desenvolvimento e esporulação diferem das do *P. parasitica*, penso que com meios de cultura adequados para os géneros citados, poder-se-á investigar adequadamente o assunto.

As condições do meio onde os cotilédones se encontravam poderão provavelmente explicar o aparecimento de esporos com formas anormais. Os cotilédones bem esporulados foram transportados para Castelo Branco em caixas de Petri seladas com parafilme e só ao fim de 2 a 3 dias foram observados ao microscópio óptico. Num meio selado, muito húmido e com o material vegetal a senescer, o fungo poderá eventualmente apresentar um desenvolvimento anormal. Esta hipótese deverá ser devidamente investigada.

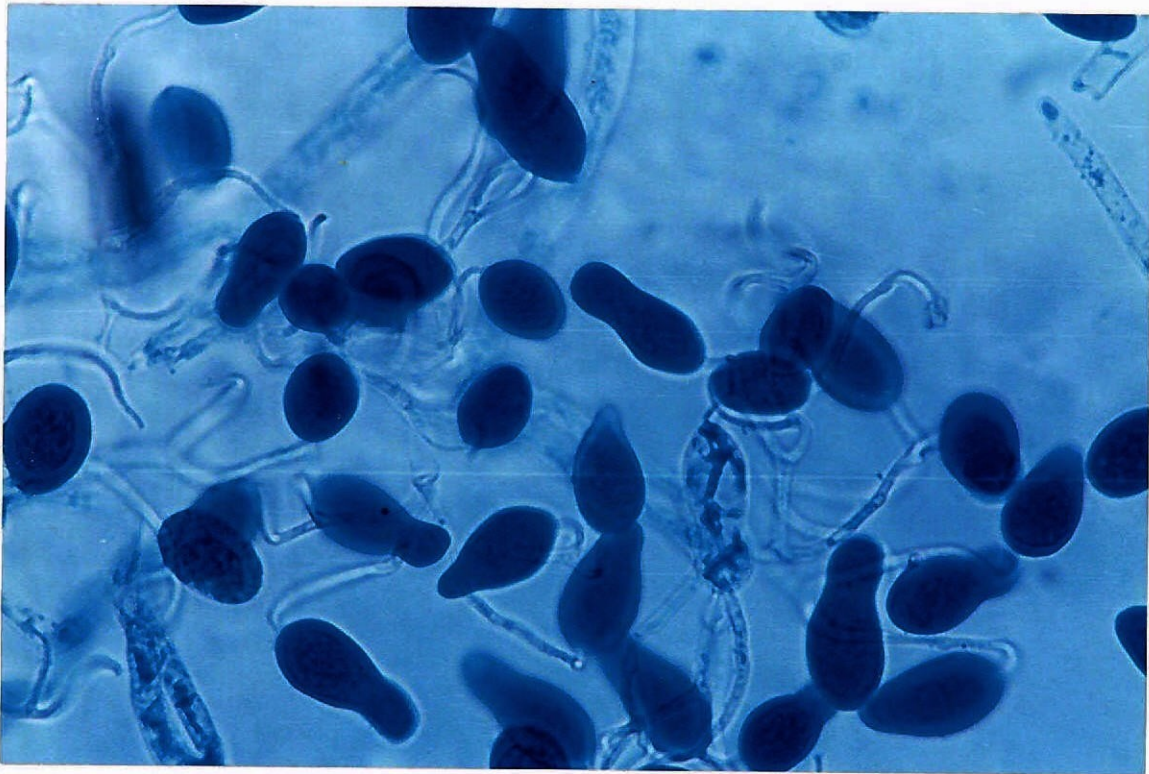


Figura 3. 16 - Conídios do isolamento proveniente de Vila Real apresentando formas anormais. Preparação utilizando azul de algodão. (Ampl. 534x).



Figura 3. 17 - Pormenor de dois conídios com forma anormal. Preparação com azul de algodão. (Ampl. 534x).



Figura 3. 18 - Aspecto de um conídio de forma anormal ligado a um ramo do conidióforo. Note-se a forma de "garrafa" que o conídio apresenta. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).

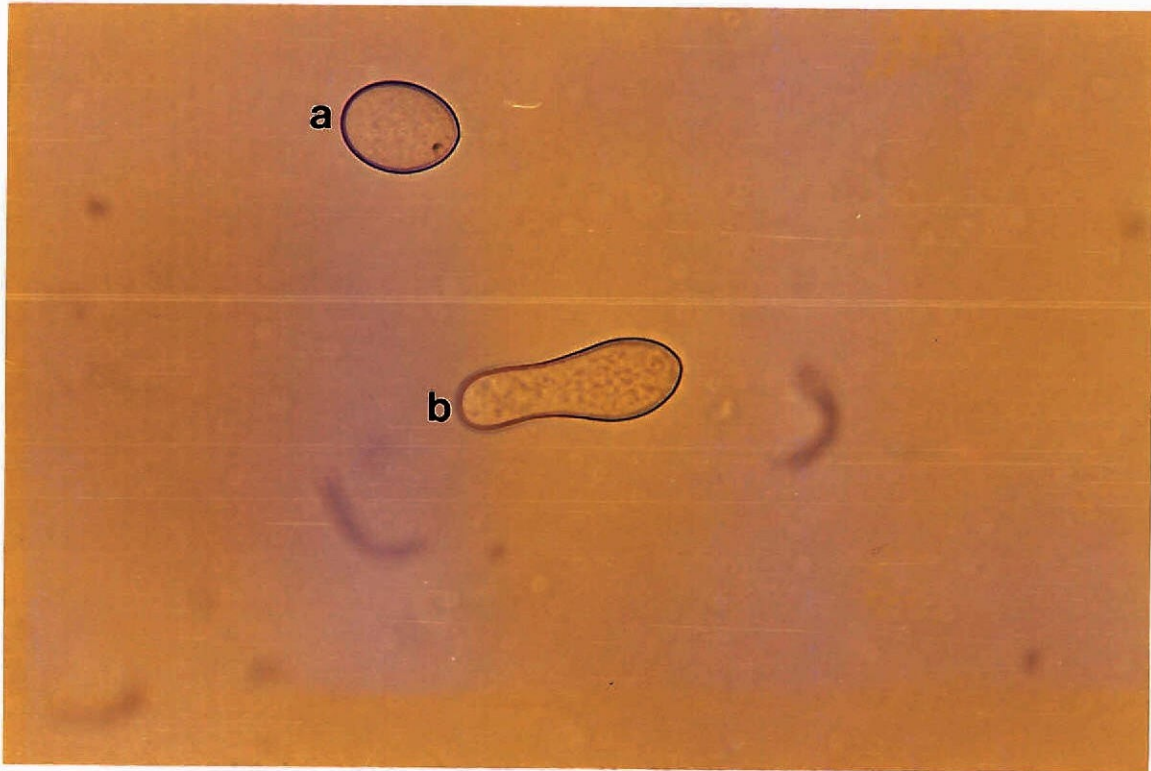


Figura 3. 19 - Contraste entre um conídio de forma normal (a), com um de forma anormal (b). Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).

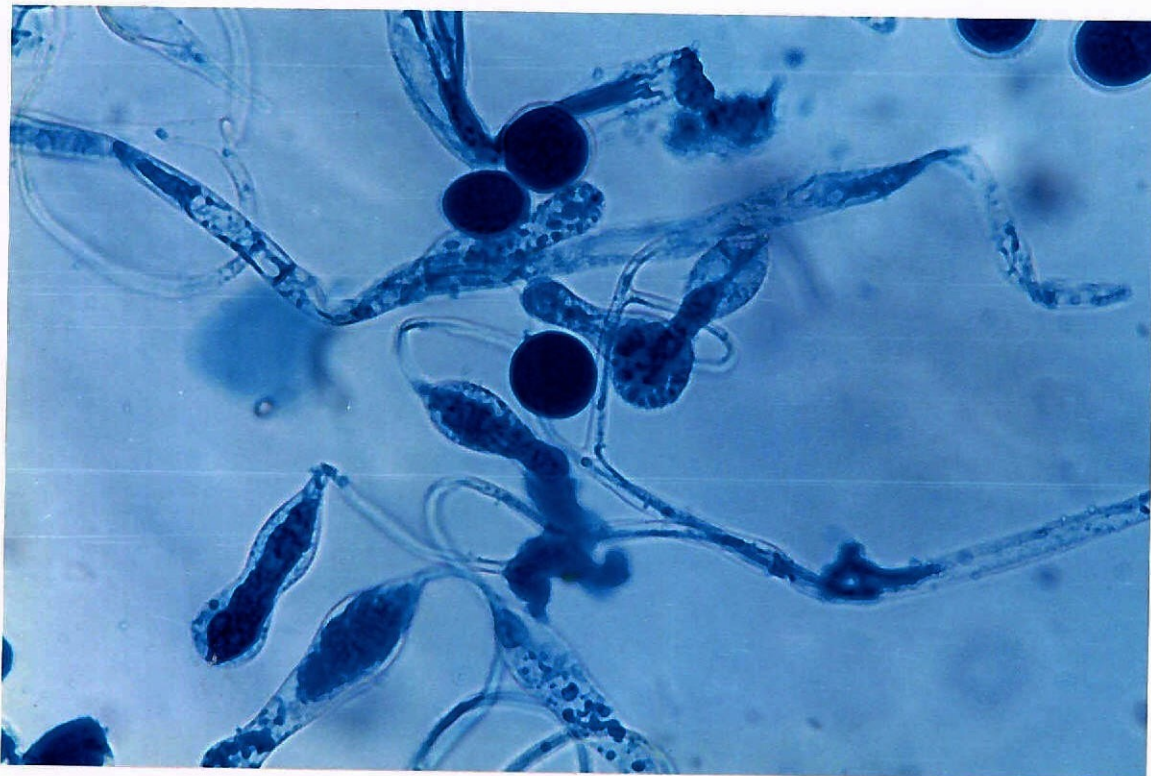


Figura 3. 20 - Conidióforo e conídios de formas "esquisitas". Note-se o comprimento anormal dos esterigmas e a diminuta absorção do corante. Preparado com azul de algodão. (Ampl. 534x).



Figura 3.21 - Pormenor de conídio de forma anormal ligado a um longo e encurvado esterigma. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).



Figura 3.22 - Aspecto de um conidióforo e conídios no início da formação das formas "esquisitas". Note-se: (a) alongamento em bico dos conídios; (b) arredondamento do mesmo bico; (c) conídio com a forma anormal. Preparação com lactofenol. (Ampl. 534x).

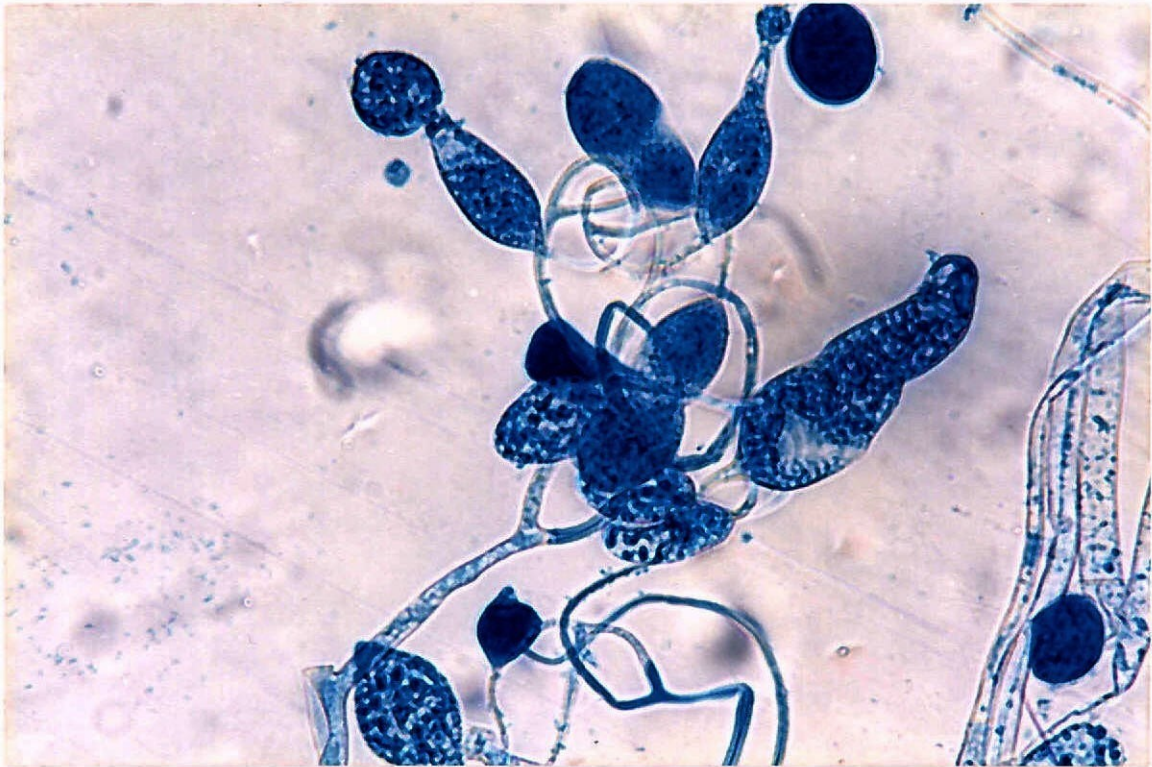


Figura 3. 23 - Aspecto de um conidióforo com vários conídios com formas anormais ligados a esterigmas muito encurvados. Note-se o pormenor da limitada absorção do azul de algodão pelo citoplasma. (Ampl. 534x).

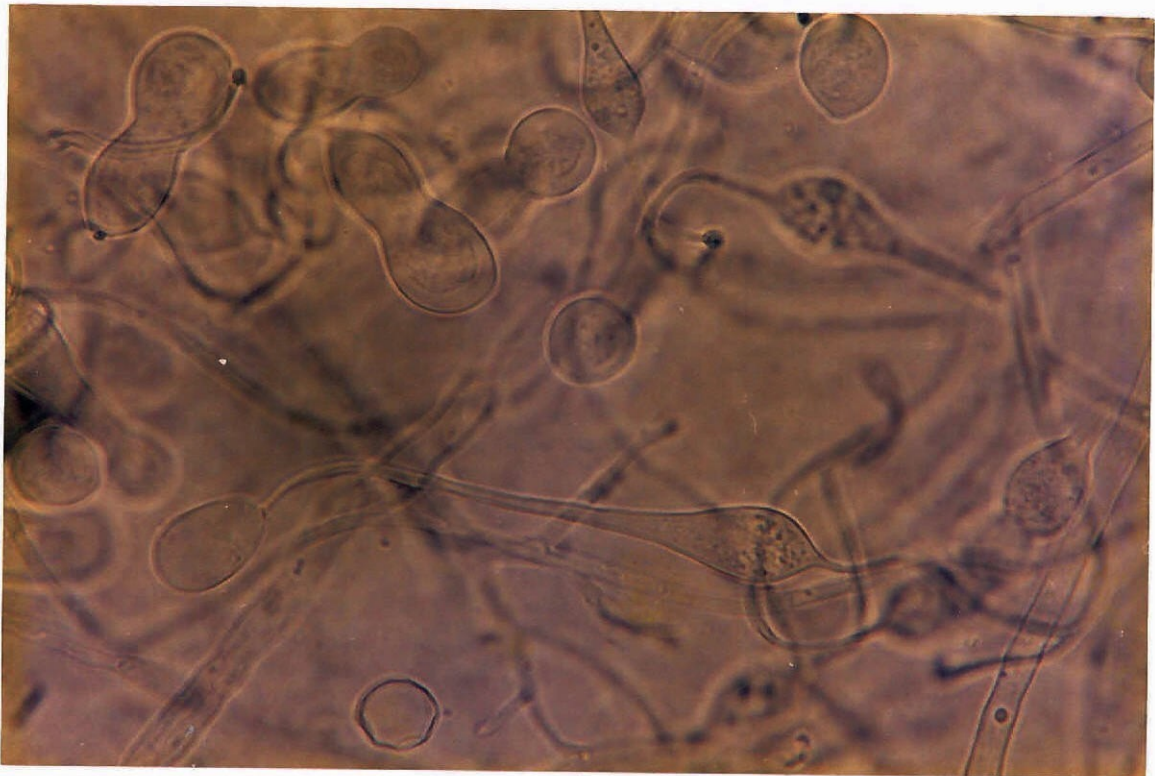


Figura 3. 24 - Aspecto do alongamento dum conídio anormal, parecendo que apresenta na extremidade um outro esporo com a forma normal, notando-se a distribuição do citoplasma em toda a estrutura. Preparação em lactofenol. (Ampl. 534x).



Figura 3. 25 - Pormenor de dois conídios de forma anormal que parecem estar a sofrer um alongamento, notando-se que o citoplasma desses conídios parece não absorver convenientemente o azul de algodão da preparação. (Ampl. 534x).



Figura 3. 26 - Conídio de forma anormal parecendo estar a bifurcar-se em dois longos ramos, vendo-se numa das extremidades um novo conídio. Preparação em lactofenol. (Ampl. 534x).

**Heterotalismo e
homotalismo em
isolamentos**

portugueses de

Peronospora parasitica

(Pers. ex. fr.) fr.

4 - HETEROTALISMO E HOMOTALISMO EM ISOLAMENTOS PORTUGUESES DE *PERONOSPORA PARASITICA* (Pers. ex Fr.) Fr.

4.1. Introdução

Muitos fungos possuem mecanismos genéticos que previnem o acasalamento ("mating") entre células geneticamente idênticas e que se denominam, sistemas de acasalamento ("mating systems"). Os fungos que possuem tais mecanismos são chamados auto-estéreis ou heterotáticos, pois exigem o envolvimento de diferentes estirpes para que haja acasalamento. Nos principais grupos de fungos, existem espécies auto-férteis ou homotáticas, onde o processo sexual pode ocorrer entre células geneticamente idênticas. O fenómeno do homotalismo é chamado primário, se não houver provas de antepassados heterotáticos e secundário ou pseudocompatível,

se existirem provas de heterotalismo nos antecessores do fungo (Carlile e Watkinson, 1994).

O fungo *Peronospora parasitica* apresenta formas heterotáticas assinaladas por DeBruyn (1937), McMeekin (1960), Kluczewski e Lucas (1983) e Sherriff e Lucas (1989a e 1989b), assim como formas homotáticas (DeBruyn, 1937; Sherriff e Lucas, 1989b). As duas formas de esporulação sexuada são muito importantes na manutenção e evolução do fungo. Foram estudadas por Sherriff e Lucas (1989b), que ao caracterizarem vários isolamentos de *P. parasitica* do Reino Unido identificaram dois tipos de compatibilidade sexual (SCT) designados por P1 e P2, em isolamentos provenientes de *Brassica oleracea*. As formas heterotáticas do fungo pertencem a um destes dois tipos.

Estudos citogenéticos realizados por Sherriff e Lucas (1989a) mostram que as formas homotáticas de *P. parasitica* exibem normalmente homotalismo secundário. Os autores encontraram em todos os isolamentos um anel de quatro cromossomas por altura da metafase I da meiose. Comparando com observações similares efectuadas em outros fungos da classe *Oomycetes*, nomeadamente em espécies de *Phytophthora* e no míldio das alfaces (*Bremia lactucae*), o citado anel é interpretado como um complexo de translocação recíproco entre cromossomas que possuem os alelos dos dois tipos de acasalamento. Em isolamentos homotáticos, foi observado um quinto cromossoma associado ao anel de quatro, sendo a auto-fertilidade destes isolamentos explicada pela presença dum terceiro alelo, que caracteriza o tipo de acasalamento, no quinto cromossoma.

Nada se conhece sobre a ocorrência de formas heterotáticas e homotáticas em Portugal. Neste capítulo, apresentaremos a primeira caracterização sexual de isolamentos de *P. parasitica* provenientes de várias regiões de Portugal.

4.2. Material e métodos

Neste estudo foram utilizados os 15 isolamentos de *P. parasitica* descritos em 3.2, que foram recolhidos em diferentes regiões de Portugal onde as brássicas são cultivadas, representando condições ecológicas diversas (Figura 3.1., Quadro 3.1.).

Dois isolamentos devidamente caracterizados, provenientes do Reino Unido, P005 e P006, pertencendo respectivamente aos dois tipos de compatibilidade sexual P1 e P2 (Quadro 4.1), foram utilizados como testemunhas. Como esses isolamentos são heterotáticos, não formam oósporos *persi*, mas unicamente quando misturados com um isolamento de tipo de emparelhamento oposto.

Quadro 4.1 - Características dos isolamentos de *P. parasitica* provenientes do Reino Unido (adaptado de Moss *et al*, 1994).

Isolamento	Hospedeiro de origem	Hospedeiro de manutenção	SCT ^a	RM ^b	<u>Virulência específica sobre o hospedeiro^c</u>				
					<i>Brassica oleracea</i> FOS	<i>B.rapa</i> PG	<i>B. napus</i> JP	D	C
P005	<i>B. oleracea</i>	CrGC 3.4	P1	S	+ ^d	-	-	(+)	-
P006	<i>B. oleracea</i>	CrGcC 3.4	P2	I	+	+	-	(+)	-

^a Tipo de compatibilidade sexual (P1 ou P2)

^b Resposta ao metalaxil (S = sensível, I = insensível)

^c Variedades (FOS = Flowers of Spring, PG = Palermo Green, JP = Jade Pagoda, D = Duplo,

C = Cresor)

^d + = virulento, (+) = parcialmente virulento, - = não virulento

4.2.1. Obtenção de isolamentos por esporo único

Após a recuperação dos isolamentos congelados seguindo o processo descrito em 3.2.2., estabeleceram-se, para cada um deles, culturas de esporo único, com uma repetição, tendo como objectivo separar micélios geneticamente diferentes eventualmente existentes no isolamento.

No início do estudo adoptou-se para os primeiros cinco isolamentos (P501 a P505), o método descrito por Sherriff e Lucas (1989b) com algumas modificações, que consistiu no seguinte:

- num frasco de Schott de 100ml efectuou-se uma suspensão de conídios com água destilada e ajustou-se a concentração até aos 100 esporos ml⁻¹;
- pipetou-se 1ml da suspensão do frasco e espalhou-se numa placa de Petri contendo uma solução com 1% de agar e água destilada previamente seca numa cabine de fluxo laminar, eliminando o excesso de líquido com uma pipeta;
- usando uma lupa com uma ampliação de 30x e com a placa virada para baixo, procuraram-se os conídios, fáceis de encontrar pelo seu aspecto hialino e brilhante. Com um marcador de feltro de ponta fina, marcou-se o local do conídio, confirmando depois ao microscópio óptico (100x), se no círculo marcado não existia mais nenhum conídio;

- cortou-se depois o bloco de agar que continha o esporo e colocou-se em posição invertida sobre a página superior dum cotilédone de CrGC 3.4 com 7 dias de idade, previamente posto em cima de papel de filtro humedecido com água esterilizada numa placa de Petri de 6cm de diâmetro;

- utilizaram-se 15 placas por isolamento. Em cada placa foram colocados 2 a 3 cotilédones, sendo um deles usado como testemunha, isto é, sem inoculação;

- selou-se a placa de Petri com parafilme para evitar contaminações exteriores e seguiu-se o método descrito no capítulo 3 para a incubação e a esporulação do fungo.

Para os restantes isolamentos (P506 a P515), utilizou-se o método descrito por Moss *et al.* (1994), por se achar que era mais simples e expedito. Colheu-se um cotilédone que apresentava boa esporulação e com a ajuda de uma agulha de inoculação e duma pinça, devidamente esterilizadas à chama duma lamparina, raspavam-se cuidadosamente os conídios para uma placa de Petri contendo agar a 1% e água destilada. A placa foi examinada à lupa com uma ampliação de 30x para localizar os conídios. Cada conídio foi retirado por capilaridade para dentro duma fina pipeta de Pasteur, previamente mergulhada em água destilada, sendo então o esporo expelido para cima dum cotilédone de CrGC 3.4, soprando devagarinho na pipeta. O cotilédone estava nas mesmas condições descritas anteriormente e a partir desse momento, seguiram-se os passos acima citados para o método de Sherriff e Lucas (1989b).

Para qualquer um dos métodos, ao fim de 7 dias, as inoculações bem sucedidas apresentavam esporulação como se observa na Figura 4.1.

Com o objectivo de obter maior quantidade de inóculo, já que a esporulação obtida num cotilédone por inoculação com esporo único não era suficiente para as inoculações simultâneas que se iriam efectuar com os isolamentos provenientes do Reino Unido (P005 e P006), procedeu-se à subcultura de cada um dos isolamentos portugueses. Retirou-se um cotilédone da placa de Petri com uma pinça devidamente esterilizada e introduziu-se num tubo de centrífuga com 1-2 ml de água destilada. Centrifugou-se a 2000 rotações durante 3 minutos para se conseguir o máximo de concentração de conídios. Em seguida, inocularam-se, com uma pipeta de Eppendorf, cotilédones de plantas de CrGC 3.4 susceptíveis, previamente semeadas em 2 pequenos vasos 5-7 dias antes. Os vasos foram depois colocados num propagador, selado com parafilme, para que não houvesse contaminações externas e levado à câmara de incubação por 16-24 horas a 16°C. Após o que se seguiu o método em 3.2.2 para a obtenção de esporulação do *P. parasitica*.



Figura 4.1 - Esporulação de *P. parasitica* num cotilédone de CrGC 3.4 inoculado com esporo único. Note-se que os dois outros cotilédones que serviram de testemunhas não apresentam nenhuma esporulação.

4.2.2. Inoculação simultânea de dois isolamentos de *Peronospora parasitica*

Para a inoculação simultânea entre cada um dos 15 isolamentos portugueses e os dois provenientes do Reino Unido foram preparadas separadamente suspensões conidiais. Os conídios foram contados num hemocitómetro com a ajuda dum microscópio óptico (Nikon Optiphot - 2), utilizando uma ampliação de 100x, ajustando depois a concentração de esporos para $5 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$. Misturaram-se em frascos "Schott", volumes iguais de cada um dos 15 isolamentos com o isolamento P005 e depositou-se uma gota de $10 \mu\text{l}$ da suspensão com uma pipeta de "Eppendorf" sobre os cotilédones de CrGC 3.4. A mesma técnica foi utilizada com o isolamento P006. Foram feitas inoculações equivalentes com suspensões de esporos não misturados, servindo como testemunhas.

Os vasos contendo os cotilédones, foram em seguida postos em propagadores hermeticamente fechados com parafilme e a partir deste momento, seguiu-se o método descrito em 3.2.2 para a incubação e propagação de isolamentos.

4.2.3. Preparação do material vegetal para análise microscópica

Os cotilédones provenientes da inoculação simultânea de cada isolamento com P005 e P006 foram colhidos ao fim de 5-7 dias, colocados num copo de "Erlenmeyer" e fervidos por 2 minutos numa solução de lactofenol-etanol contendo: 10g de fenol, 20ml de glicerol, 10 ml de ácido láctico e 20 ml de etanol a 96% (v/v) (Heath, 1971; Sherriff e Lucas, 1989b). O material limpo de pigmentos clorofilinos foi deixado na solução por 24 horas e, ao fim deste tempo, lavado com água destilada e guardado em glicerol a 70% (v/v), para ser examinado ao microscópio. Os cotilédones guardados dessa maneira puderam ser analisados várias semanas depois e registados fotograficamente com um "Wild Photoautomat MP45".

Utilizou-se também para a análise da presença ou ausência de oósporos, uma outra técnica sugerida por Leckie (comunicação pessoal), que consistiu, simplesmente, em colher os cotilédones cobertos de esporulação de cada uma das inoculações simultâneas, colocando-os num frasco de "Schott" de 50ml com álcool a 60% (v/v). Substituindo diariamente o álcool, ao fim de 3-4 dias o material estava pronto para ser examinado ao microscópio.

Para qualquer um dos métodos anteriores, fez-se a montagem dos cotilédones numa lâmina de vidro com uma gota de glicerol a 70% (v/v), segundo Sherriff e Lucas (1989b). Examinaram-se ao microscópio 30 cotilédones por cada inoculação, usando ampliações de 100x e 400x e considerou-se que haveria compatibilidade entre os isolamentos, se mais de 80% dos cotilédones apresentassem oósporos.

Finalmente, testou-se um novo método para os cotilédones que apresentavam uma elevada esporulação e cujos fenótipos de interacção eram evidentes. Esses cotilédones foram colhidos em fase de senescência e esmagados minuciosamente num almofariz com algumas gotas de água destilada. O material foi então retirado com uma pinça de pontas finas para uma lâmina de vidro contendo uma gota de lactofenol e seguidamente, observado ao microscópio com ampliações de 100x e 400x.

4.3. Resultados e discussão

No estabelecimento de esporos únicos para os cinco primeiros isolamentos (P501 a P505), adoptou-se o método de Sherriff e Lucas (1989b). Enquanto estes autores conseguiram taxas de infecção de 40-70%, no presente trabalho obtiveram-se valores mais baixos, cerca de 25-30%, provavelmente por falta de eficácia na

selecção individual dos conídios à lupa, ou na remoção do pequeno pedaço de agar que continha o conídio.

O método de Moss *et al.* (1994) adoptado nos restantes isolamentos (P506 a P515), conduziu regularmente a taxas de infecção de cerca de 70%.

Na preparação do material vegetal para análise microscópica, embora o método sugerido por Leckie (comunicação pessoal) seja expedito, deparamos muitas vezes com problemas de clarificação dos cotilédones para registar fotograficamente o material, o mesmo acontecendo com o método de esmagamento de cotilédones. De qualquer modo, é de levar em conta estes dois métodos por serem simples e rápidos, se o objectivo é somente a pesquisa da presença ou ausência de oósporos em cruzamentos simultâneos de dois isolamentos. Neste trabalho optou-se fundamentalmente pelo método descrito por Heath (1971), adoptado por Sherriff e Lucas (1989b), já que o material vegetal ficava bem clarificado e os oósporos bem visíveis para serem fotografados (Figuras 4.2 e 4.3).

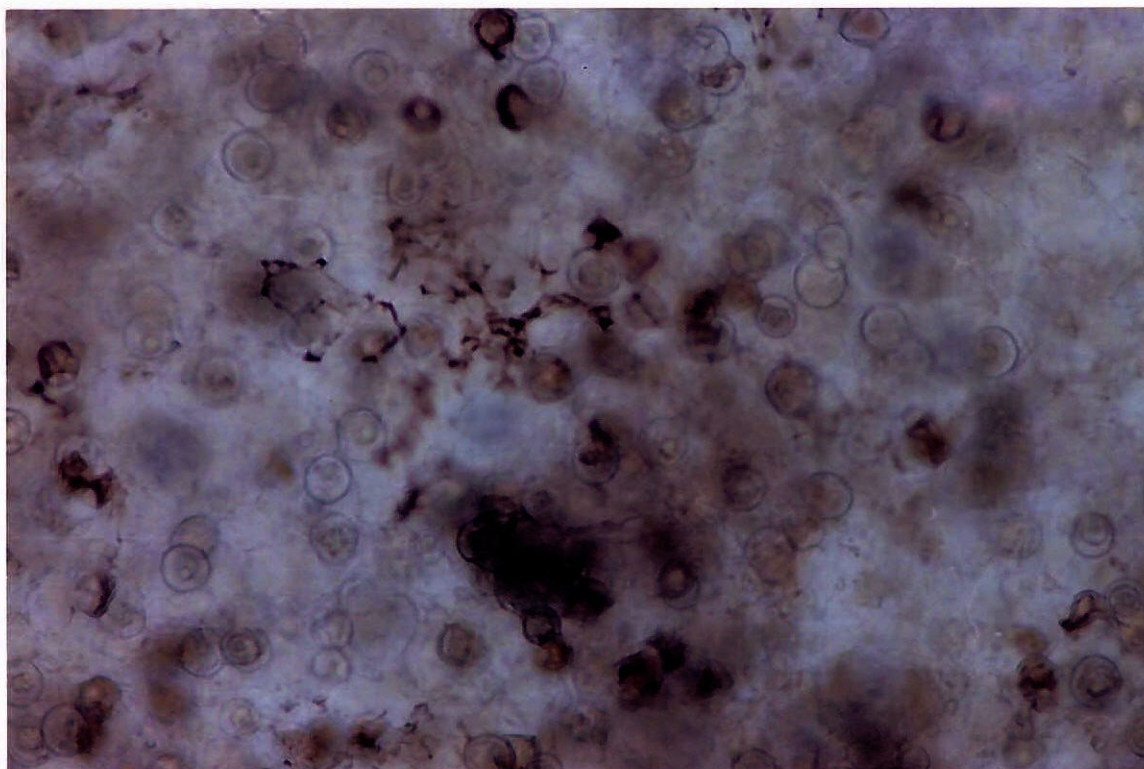


Figura 4. 2 - Aspecto de oósporos de *P. parasitica* obtidos do cruzamento entre os isolamentos P508(Condeixa) x P006(Reino Unido). Preparação em lactofenol. (Ampl. 133x).

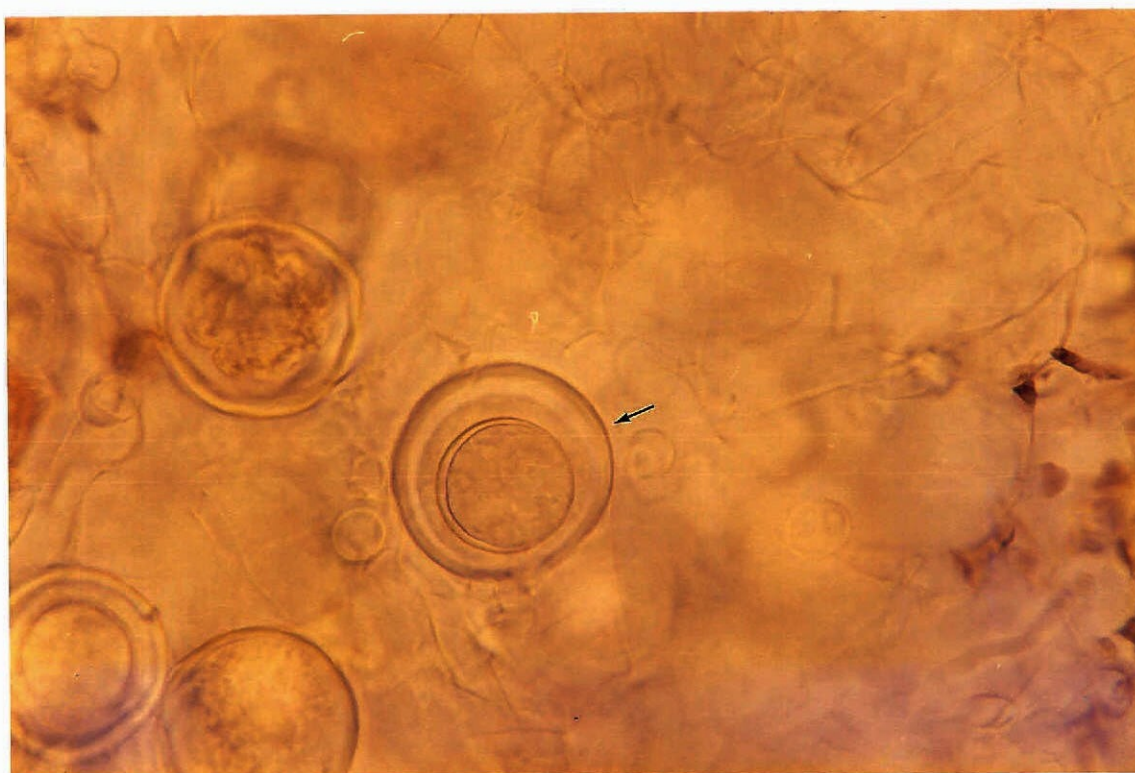


Figura 4.3 - Pormenor de oósporo de *P. parasitica* proveniente de cruzamento entre P508(Condeixa) x P006(Reino Unido), notando-se a dupla parede. Preparação em lactofenol. (Ampl. 534x).

Os resultados das inoculações simultâneas entre os quinze isolamentos portugueses de *P. parasitica* e os dois provenientes do Reino Unido são apresentados nos Quadros 4.2. Registaram-se três tipos de comportamento:

a) produção de oósporos quando os isolamentos são inoculados sózinhos ou em conjunto com P005 e P006, em P501(Batalha) e P504 (Castelo Branco);

b) produção de oósporos unicamente quando os isolamentos são inoculados com P005 (U.K), não havendo oósporos nas inoculações com P006 e sózinhos, em P502 (Póvoa de Varzim), P503 (Oliveira do Hospital), P505 (Évora), P506 (Odemira), P507 (Batalha), P509 (Vila Real), P511 (Lourinhã), P512 (Batalha), P514 (Condeixa) e P515 (Condeixa);

c) produção de oósporos unicamente quando os isolamentos são inoculados com P006 (U.K.), não havendo oósporos nas inoculações com P005 e sózinhos, em P508 (Condeixa), P510 (Faro) e P513 (Pombal).

Quadro 4.2 - Percentagem de cotilédones com oósporos ^(a) nos cruzamentos entre 15 isolamentos portugueses de *Peronospora parasitica* e dois isolamentos do Reino Unido

Isolamentos		Percentagem de cotilédones com oósporos ^(a)														
Origem	Nº de Ref.	P501	P502	P503	P504	P505	P506	P507	P508	P509	P510	P511	P512	P513	P514	P515
Batalha 2	P501	80														
Póvoa	P502		0													
O.Hospital	P503			0												
C.Branco	P504				80											
Évora	P505					0										
Odemira	P506						0									
Batalha 1	P507							0								
Condeixa 2	P508								0							
Vila Real	P509									0						
Faro	P510										0					
Lourinhã	P511											0				
Batalha 3	P512												0			
Pombal	P513													0		
Condeixa 3	P514														0	
Condeixa 4	P515															0
Reino Unido	P005	80	80	90	80	90	80	85	0	90	0	80	90	0	85	85
Reino Unido	P006	80	0	0	80	0	0	0	85	0	90	0	0	85	0	0

(a) Todos os cotilédones com oósporos apresentaram um nº superior a 100

Assim, consideram-se os isolamentos do grupo a) homotáticos, os do grupo b) heterotáticos do grupo de acasalamento do P006 e os do grupo c), também heterotáticos mas do grupo de acasalamento do P005, conforme se apresenta no quadro 4.3.

Quadro 4.3 - Tipo de compatibilidade sexual (SCT) de quinze isolamentos de *P. parasitica* portugueses e dois do Reino Unido.

<u>Isolamentos</u>		<u>Tipo de compatibilidade sexual</u>		
		<u>Homotático</u>	<u>Heterotático</u>	
<u>Origem</u>	<u>Referência</u>		<u>Tipo de acasal.(P1)</u>	<u>Tipo de acasal.(P2)</u>
Batalha	P501	X		
Póvoa de Varzim	P502			X
Oliveira Hospital	P503			X
Castelo Branco	P504	X		
Évora	P505			X
Odemira	P506			X
Batalha	P507			X
Condeixa	P508		X	
Vila Real	P509			X
Faro	P510		X	
Lourinhã	P511			X
Batalha	P512			X
Pombal	P513		X	
Condeixa	P514			X
Condeixa	P515			X
Reino Unido	P005		X	
Reino Unido	P006			X

De acordo com a designação proposta por Sherriff e Lucas (1989b), os isolamentos P508 (Condeixa), P510 (Faro) e P513 (Pombal) pertencem ao tipo de acasalamento P1, enquanto que os isolamentos P502 (Póvoa de Varzim), P503 (Oliveira do Hospital), P505 (Évora), P506 (Odemira), P507 (Batalha), P509 (Vila Real), P511 (Lourinhã), P512 (Batalha), P514 (Condeixa) e P515 (Condeixa) pertencem ao tipo de acasalamento P2. Estes resultados estão de acordo com as descobertas de De Bruyn (1937) e Sherriff e Lucas (1989b) e são um exemplo da natureza heterotática duma porção da população de *P. parasitica*.

Os isolamentos P501 (Batalha) e P504 (Castelo Branco) são auto-férteis (homotáticos).

Sherriff e Lucas (1989b) avançam com quatro possíveis causas na explicação

da auto-fertilidade: os isolamentos eram populações heterotáticas misturadas dos dois tipos de acasalamento; os isolamentos eram heterocarióticos e continham os dois tipos de acasalamento em diferentes núcleos; o homotalismo aparente poderá ter sido induzido por algum factor ambiental; os isolamentos eram genuinamente homotáticos.

A primeira causa só se verificaria se o estabelecimento de linhas monoconidiais não reduzisse os isolamentos a um único tipo de acasalamento, sendo a produção de oósporos simplesmente devida à presença duma população mista. McMeekin (1960) e Kluczewski (1981) mostram que, efectuando subculturas dum inóculo misto contendo os tipos de acasalamento P1 e P2, um deles depressa é seleccionado.

A causa ligada à heterocariose, não é facilmente resolvida pela técnica de esporo único. Davison (1968b) demonstrou, que cada conídio contém mais de trinta núcleos e Michelmore e Ingram (1982) trabalhando com *Bremia lactucae*, chegaram à conclusão que a maioria das linhas monoconidiais retêm a auto-fertilidade, o que indica que esta é uma propriedade relativamente estável. Os mesmos autores sugerem, então, que a segregação ocasional de linhas auto-estéreis pode ter envolvido uma heterocariose temporária.

A terceira explicação para o homotalismo diz respeito à influência do meio. A principal influência ambiental sobre os fungos biotróficos obrigatórios como *P. parasitica*, é a planta hospedeira (Sherriff e Lucas, 1989b). Até à data, a inoculação de diferentes hospedeiros com isolamentos auto-estéreis pertencendo a tipos de acasalamento opostos, não têm fornecido provas que o comportamento homotático do fungo seja induzido pela planta hospedeira.

Finalmente, Sherriff e Lucas (1989a) provam com estudos citogenéticos, que na realidade as formas homotáticas do míldio das crucíferas são genuínas. Assim, parece haver elevada possibilidade dos isolamentos encontrados P501 (Batalha) e P504 (Castelo Branco) serem genuínos, o que está de acordo com Sherriff e Lucas (1989a).

Os trinta cotilédones inoculados com cada um dos isolamentos portugueses obtidos por esporo único e conjugados com P005 e P006, apresentaram oósporos em cerca de 80 a 90%. Em cada um dos cotilédones, o número de oósporos ultrapassou a centena, não se tendo conseguido apurar uma técnica minimamente fiável para contabilizar o seu total. Numa primeira abordagem, pensa-se que a alta percentagem de cotilédones com tão grande número de oósporos era, provavelmente, o resultado de inoculações num hospedeiro muito susceptível (CrGC 3.4). Esta hipótese eventualmente não tem razão de ser, já que Kluczewski e Lucas (1983) afirmam, que a completa susceptibilidade do hospedeiro a um conjunto de dois isolamentos inoculados não é um pré-requisito para a formação de oósporos. Nas suas experiências - com dois isolamentos provenientes respectivamente de couve-flor (C1) e colza (R1) -, constataram que os oósporos se formavam em grandes quantidades em cultivares de *Brassica napus* que eram parcialmente resistentes ao isolamento C1.

Comparando os resultados agora obtidos com os de Sherriff e Lucas (1989b) no Reino Unido, pode afirmar-se, que a situação dos isolamentos portugueses de *P. parasitica* em relação ao fenómeno do homotalismo e heterotalismo é bastante semelhante à detectada no Reino Unido. O fenómeno da auto-esterilidade é apresentado por 13 dos 15 isolamentos (Quadros 4.2 e 4.3), o que está de acordo com os resultados de Sherriff e Lucas (1989), que em isolamentos provenientes de diferentes hospedeiros do género *Brassica* colhidos em diversas regiões da Grã-Bretanha, descobriram que havia predominância de fungos heterotáticos. As formas homotáticas, foram encontradas pelos mesmos autores em 2 dos 12 isolamentos obtidos de *B. oleracea*, enquanto que no presente trabalho obtiveram-se 2 em 15 dos isolamentos.

O fenómeno do homotalismo, aparecendo em regiões tão diversas como Batalha e Castelo Branco, poderá eventualmente ocorrer noutras regiões de Portugal, se for feita um levantamento mais exaustivo de isolamentos de *P. parasitica* em *B. oleracea*.

Não me surpreendeu encontrar na Batalha formas homotáticas e heterotáticas e estas últimas, com tipos de acasalamento diferentes (P1 e P2). A produção de brássicas nessa região tem um peso económico muito importante e os isolamentos foram colhidos num campo onde se vêm realizando ensaios de campo com brássicas há vários anos. Deste modo, a existência duma grande quantidade de hospedeiros com diferentes fenótipos de interacção, origina o aparecimento de uma grande diversidade na genética e na virulência do *P. parasitica*.

**Caracterização
morfológica dos
conídios de**

Peronospora parasitica

(Pers. ex Fr.) Fr.

5 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DOS CONÍDIOS DE *PERONOSPORA PARASITICA* (Pers. ex Fr.) Fr.

5.1. Introdução

O estudo das estruturas reprodutivas assexuadas tem estado ligado, ao longo dos anos, a possíveis critérios taxonómicos para a delimitação de espécies de *Peronospora* (Gaumann, 1918; Gustavsson, 1959; Yerkes e Shaw, 1959).

De Bary (1863) apresentou o primeiro método para circunscrever as espécies de *Peronospora*, tentando manter ao máximo a regra, uma família de hospedeiro - uma espécie de *Peronospora*. As espécies não foram totalmente caracterizadas com base na morfologia, mas esta permaneceu como base principal para a diferenciação das espécies. O mesmo investigador só fez excepções dentro das grandes famílias de hospedeiros, onde havia pronunciadas diferenças na morfologia do agente

patogénico, especialmente nos caracteres dos oósporos, reconhecendo nessa altura os fungos: *Peronospora viciae* e *P. trifolium* como agentes patogénicos nas leguminosas.

Gaumann (1918) abordando o problema numa base inteiramente diferente, estudou a fisiologia e a morfologia do *P. parasitica*. O estudo da morfologia incidiu sobre os oósporos, os conidióforos e os conídios, especialmente as suas dimensões. Os oósporos foram considerados sem nenhum valor sistemático, ao contrário do que afirmava DeBary(1863) e seus seguidores, porque apresentavam uma estrutura uniforme em qualquer hospedeiro da família das crucíferas onde eram encontrados, facto confirmado por Yerkes e Shaw (1959). Em contrapartida, os conidióforos e os conídios foram medidos por Gaumann (1918), que apresentou provas de numerosas raças ou formas patogénicas, cada qual com uma gama limitada de hospedeiros. Baseando-se na aparente especialização de isolamentos de *Peronospora* em algumas espécies de hospedeiros, o mesmo investigador apresentou uma taxonomia alternativa em que foram descritas novas espécies de *Peronospora*, sempre que, para um particular agente patogénico, outras espécies de hospedeiros eram registadas.

Yerkes e Shaw (1959) lançaram dúvidas sobre o valor taxonómico de caracteres como o tamanho e a razão entre o comprimento e a largura dos conídios, visto que não encontraram diferenças morfológicas claras entre isolamentos de fungos provenientes de várias crucíferas. Assim, sugeriram um sistema de classificação mais harmonioso, no qual aceitaram as famílias das angiospérmicas como divisões taxonómicas arbitrárias, dando ênfase à morfologia do agente patogénico dentro de cada família. Deste modo, para que se reconheça uma ou mais espécie de *Peronospora* dentro de cada família de hospedeiro, deverá ser mostrada a ocorrência de diferenças morfológicas distintas entre grupos de isolamentos.

Dickinson e Greenhalgh (1977), continuaram a ter as mesmas dúvidas sobre a validade das medições dos conídios e chamaram a atenção para a influência dos factores ambientais, como temperatura e humidade, demonstradas por Thung (1926), sobre os conídios e conidióforos. Os seus trabalhos, suportam o sistema de classificação proposto por Yerkes e Shaw (1959).

No presente trabalho, observaram-se o comprimento, largura e à razão comprimento/largura dos conídios dos 15 isolamentos de *P. parasitica*, quando inoculados num mesmo hospedeiro (CrGC 3.4). O objectivo não foi propriamente o estudo taxonómico de espécies de *Peronospora*, mas sim, avaliar possíveis diferenças de dimensão dos conídios a nível geográfico, tentando relacioná-las com as formas homotáticas e heterotáticas encontradas nos isolamentos colhidos em diversas regiões de Portugal, servindo assim de complemento ao estudo apresentado no capítulo 4.

5.2. Material e métodos

Neste trabalho, por motivos organizacionais e estruturais do laboratório, o delineamento experimental foi feito dividindo os quinze isolamentos de *P. parasitica* em três grupos (Quadro 5.1):

- o primeiro constituído pelos isolamentos P501 (Batalha), P502 (Póvoa), P503 (Oliveira do Hospita), P504 (Castelo Branco), P505 (Évora) e P506 (Odemira);
- o segundo por P502 (Póvoa), P507 (Batalha), P508 (Condeixa), P509 (Vila Real), P510 (Faro) e P511 (Lourinhã);
- o terceiro por P512 (Batalha), P513 (Pombal), P514 (Condeixa), P515 (Condeixa) e P502 (Póvoa).

O isolamento P502 (Póvoa) foi escolhido como testemunha, por já ter sido objecto de estudo em trabalhos de avaliação do fenotipo da interacção e de melhoramento para resistência ao míldio em brássicas (Sousa *et al.*, 1994; Carvalho, 1995).

Quadro 5. 1 - Delineamento experimental para a caracterização morfológica dos conídios de *P. parasitica*.

Grupos	Isolamentos	Origem	Amostra
A	P501	Batalha 2 ^a	1
	P502	Póvoa	2 (testemunha)
	P503	Oliveira do Hospital	3
	P504	Castelo Branco	4
	P505	Évora	5
	P506	Odemira	6
B	P502	Póvoa	7 (testemunha)
	P507	Batalha 1 ^a	8
	P508	Condeixa 2 ^a	9
	P509	Vila Real	10
	P510	Faro	11
	P511	Lourinhã	12
C	P512	Batalha 3 ^a	13
	P513	Pombal	14
	P514	Condeixa 3 ^a	15
	P515	Condeixa 4 ^a	16
	P502	Póvoa	17 (testemunha)

^a - Diferentes isolamentos provenientes das regiões da Batalha e Condeixa

Para cada grupo experimental, semearam-se sementes de CrGC 3.4 em seis filas (cinco para o último bloco), de quinze alvéolos, num tabuleiro contendo turfa de estrutura fina "Levington F2". Segundo a técnica descrita no parágrafo 3.2.2., na mesma altura foi feita a recuperação dos isolamentos conservados no congelador a -30°C.

Ao fim de 6-7 dias inocularam-se os cotilédones de cada uma das filas de CrGC 3.4. e, após incubação em câmara escura a 16°C por um período de 24 horas, transferiu-se o material para uma câmara de crescimento a 20 +/- 1°C, 24h de fotoperíodo com uma intensidade média de luz de 300 mol.m².s⁻¹ e 80-90% de humidade, onde se manteve durante 6 dias. Ao 6º dia as plantas foram transferidas para a câmara de esporulação a 16°C e 100% HR. Após 24 horas, colheram-se trinta cotilédones por isolamento bem esporulados para um frasco "Schott" (100 ml) contendo água destilada, que em seguida foi agitado num agitador do tipo vortex, obtendo assim uma suspensão de conídios. Com uma pipeta "Gilson" retirou-se uma amostra da suspensão para um hemocítmetro e mediram-se os comprimentos e as larguras de 100 conídios, que se encontravam no campo dos cinco retículos do hemocítmetro, utilizando um microscópio óptico (Nikon Optiphot-2) previamente aferido com um micrómetro "Leitz".

5.3. Resultados e discussão

As dimensões dos conídios dos 15 isolamentos são apresentados no Quadro 5.2. As médias das larguras variam entre um mínimo de 18,40 µm para a amostra nº 11 (isolamento P510 da Lourinhã) e um máximo de 23,00 µm para a amostra nº 4 (isolamento P504 de Castelo Branco), estando esses valores situados em intervalos de confiança estatisticamente diferentes (Figura 5.1). Nos trabalhos de taxonomia sobre *Peronospora*, Yerkes e Shaw (1959) encontraram valores de 15,86 µm a 19,70 µm, enquanto que Gaumman (1918) encontrou em oitenta hospedeiros diferentes da família das crucíferas, larguras médias entre 13,11 µm e 24,16 µm. McMeekin (1969) obteve sobre hospedeiros alternativos de *P. parasitica*, provenientes de *Brassica oleracea* var. *capitata* e *Rhapanus sativus*, larguras médias de conídios num intervalo entre 17,80-19,30 µm. Em contrapartida, Dickinson e Greenhalg (1977), num estudo sobre a taxonomia e a gama de hospedeiros do *P. parasitica* na família das crucíferas, chegaram a valores entre 16,00 µm e 22,80 µm, relativamente similares aos obtidos no presente trabalho. Assim, os isolamentos portugueses têm largura relativamente grande em relação aos descritos por outros autores.

Quadro 5.2 - Largura, comprimento e quociente comprimento/largura dos conídios de 15 isolamentos de *P. parasitica* em cotilédones de CrGC 3.4.

Amostra	Isolamentos	Largura (μm)	Comprimento (μm)	Quociente
		Média ^{a, b}	Média ^{a, b}	(Comp./Larg.)
1	P501	18,66 \pm 0,22	24,63 \pm 0,31	1,32 \pm 0,013
2	P502	19,83 \pm 0,38	28,64 \pm 0,62	1,46 \pm 0,03
3	P503	21,24 \pm 0,37	27,31 \pm 0,40	1,30 \pm 0,02
4	P504	23,00 \pm 1,80	27,94 \pm 1,78	1,34 \pm 0,11
5	P505	20,29 \pm 0,31	26,48 \pm 0,44	1,31 \pm 0,02
6	P506	20,15 \pm 0,27	26,46 \pm 0,37	1,32 \pm 0,01
7	P502	20,24 \pm 0,35	27,32 \pm 0,46	1,36 \pm 0,02
8	P507	18,92 \pm 0,18	23,85 \pm 0,23	1,27 \pm 0,01
9	P508	19,14 \pm 0,22	24,82 \pm 0,28	1,30 \pm 0,01
10	P509	20,26 \pm 0,25	24,99 \pm 0,32	1,24 \pm 0,02
11	P510	18,40 \pm 0,16	23,90 \pm 0,28	1,30 \pm 0,01
12	P511	18,58 \pm 0,17	24,10 \pm 0,30	1,30 \pm 0,01
13	P512	19,56 \pm 0,26	25,37 \pm 0,37	1,30 \pm 0,01
14	P513	19,80 \pm 0,28	26,37 \pm 0,31	1,35 \pm 0,02
15	P514	19,86 \pm 0,25	26,76 \pm 0,31	1,35 \pm 0,01
16	P515	19,68 \pm 0,26	26,99 \pm 0,34	1,38 \pm 0,01
17	P502	19,80 \pm 0,22	25,70 \pm 0,23	1,30 \pm 0,01

^a - Cada valor representa a média das dimensões de 100 esporos

^b - Intervalo de confiança ($p \leq 95\%$, Student)

Só existem diferenças significativas para a largura média dos conídios (Scheffé com $p \leq 0,05$) entre o isolamento P504 e os isolamentos P510, P511, P501, P507 e P508, (Figura 5.1).

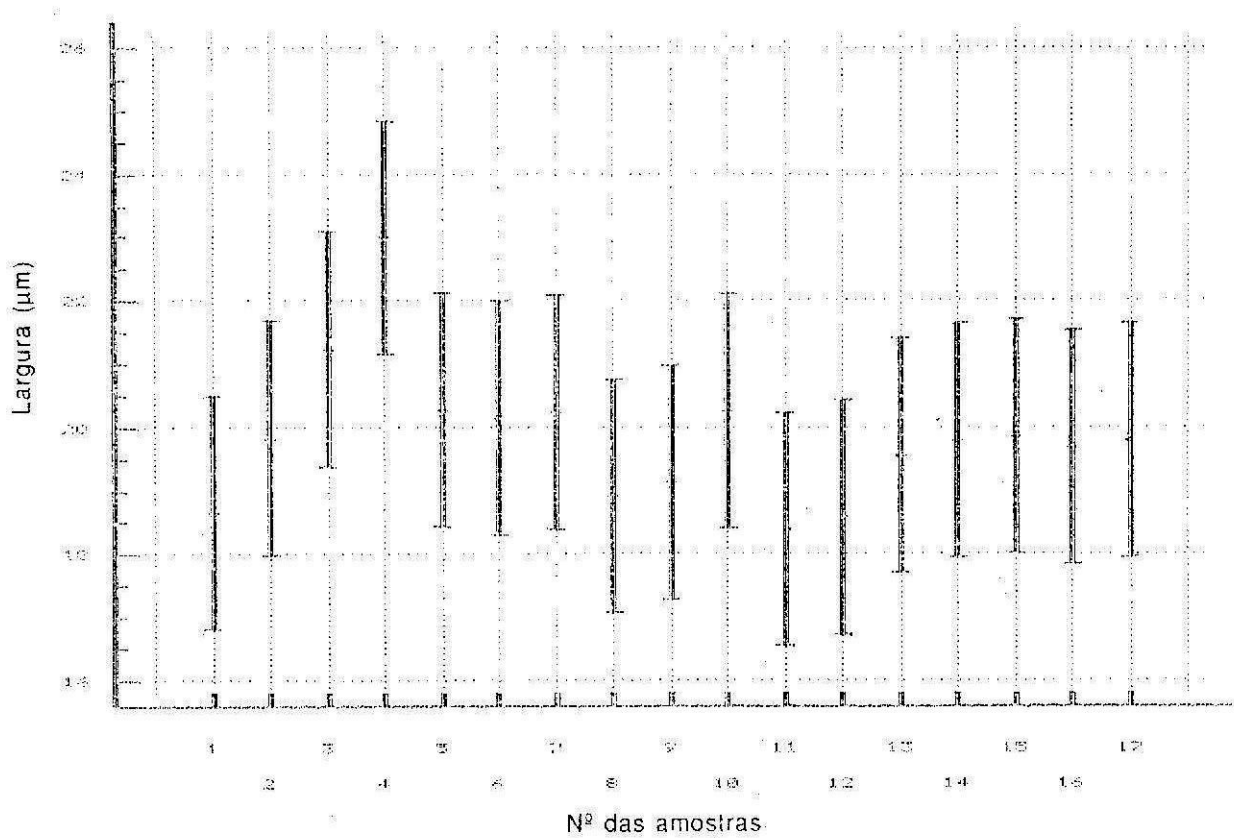


Figura 5. 1 - Intervalos de confiança das médias das larguras dos conídios ($p \leq 95\%$, Scheffé). Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2.

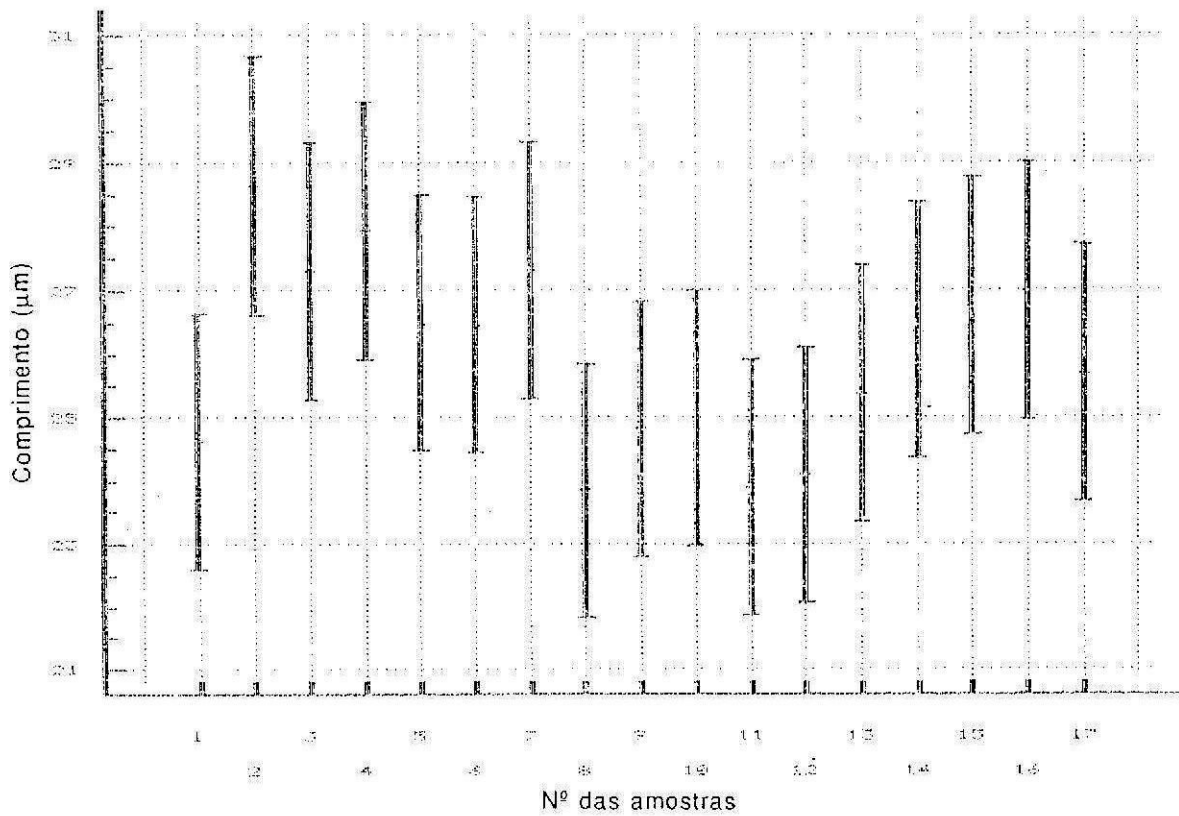


Figura 5. 2 - Intervalos de confiança das médias dos comprimentos dos conídios ($p \leq 95\%$, Scheffé). Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2.

O comprimento médio dos conídios dos 15 isolamentos variou entre 23,85 μm (P507) e 28,64 μm (P502) (Figura 5.2). O comprimento médio dos conídios do isolamento P502, nas três vezes em que foi utilizado como testemunha, variou entre 25,70 μm e 27,32 μm . Yerkes e Shaw (1959) encontraram valores de comprimento médio dos conídios entre 20,79 - 28,40 μm e Gaumman (1918) 15,17 - 27,81 μm . Em diferentes espécies de crucíferas, McMeekin (1969) obteve valores entre 21,9 - 23,00 μm e Dickinson e Greenhalgh (1977) entre 19,10 μm e 23,40 μm . Os valores obtidos no presente trabalho aproximam-se dos resultados de Yerkes e Shaw (1959).

Observam-se diferenças significativas no comprimento médio dos conídios (Scheffé com $p \leq 0,05$), entre o isolamento P502 (Póvoa) e os isolamentos P510 (Faro) e P511 (Lourinhã) e entre o isolamento P504 (Castelo Branco) e os isolamentos P507 (Batalha 1) e P510 (Faro) (Figura 5.2).

O quociente entre o comprimento e a largura dos conídios fornece uma ideia sobre a forma dos conídios (Gaumann, 1918; Yerkes e Shaw, 1959; McMeekin, 1969; Dickinson e Greenhalgh, 1977).

O quociente entre o comprimento e a largura dos conídios dos 15 isolamentos é apresentado na figura 5.3. Não se verificam diferenças significativas para o quociente entre o comprimento e a largura dos conídios (Scheffé com $p \leq 95\%$) entre os 15 isolamentos (Figura 5.3).

As amostras 2, 7 e 17 (isolamento P502 da Póvoa do Varzim) utilizadas como testemunha, exibiram valores desde 1,30, que corresponde a uma forma oval, até 1,36 e 1,46 que correspondem a formas alongadas. A amostra nº10 (isolamento P509 de Vila Real) com 1,24, que corresponde à forma mais arredondada é seguida da amostra nº 8 (isolamento P507 da Batalha) com 1,27. Os valores 1,30 e 1,31 correspondentes a formas ligeiramente ovais, podem-se encontrar nas amostras nº 17 (isolamento P502 da Póvoa do Varzim), nº3 (isolamento P503 de O. de Hospital), nº5 (isolamento P505 de Évora), nº9 (isolamento P508 de Condeixa), nº11 (isolamento P510 de Faro), nº12 (isolamento P511 da Lourinhã) e nº13 (isolamento P512 da Batalha). As amostras com quocientes entre comprimento e largura dos conídios superiores a 1,31, correspondem a conídios com formas alongadas, como as amostras nº1 (isolamento P501 da Batalha), nº4 (isolamento P504 de Castelo Branco), nº6 (isolamento P506 da Batalha), nº14 (isolamento P513 de Pombal), nº15 (isolamento P514 de Condeixa) e nº16 (isolamento P515 de Condeixa). Esperava-se uma maior homogeneidade nas formas apresentadas pelo mesmo isolamento num mesmo hospedeiro, visto que os três grupos de testagem foram testados sob as mesmas condições laboratoriais (Quadro 5.1). A diferença na temperatura ou na humidade são influentes na morfologia dos conídios e dos conidióforos (Thung, 1926). A discrepância de valores apresentada pela testemunha (P502), pode ser explicada por possíveis diferenças nas condições experimentais dos três grupos utilizados ou porque o isolamento P502, sendo heterotático, possui capacidade de variação genética, apresentando conídios com comprimentos diferentes.

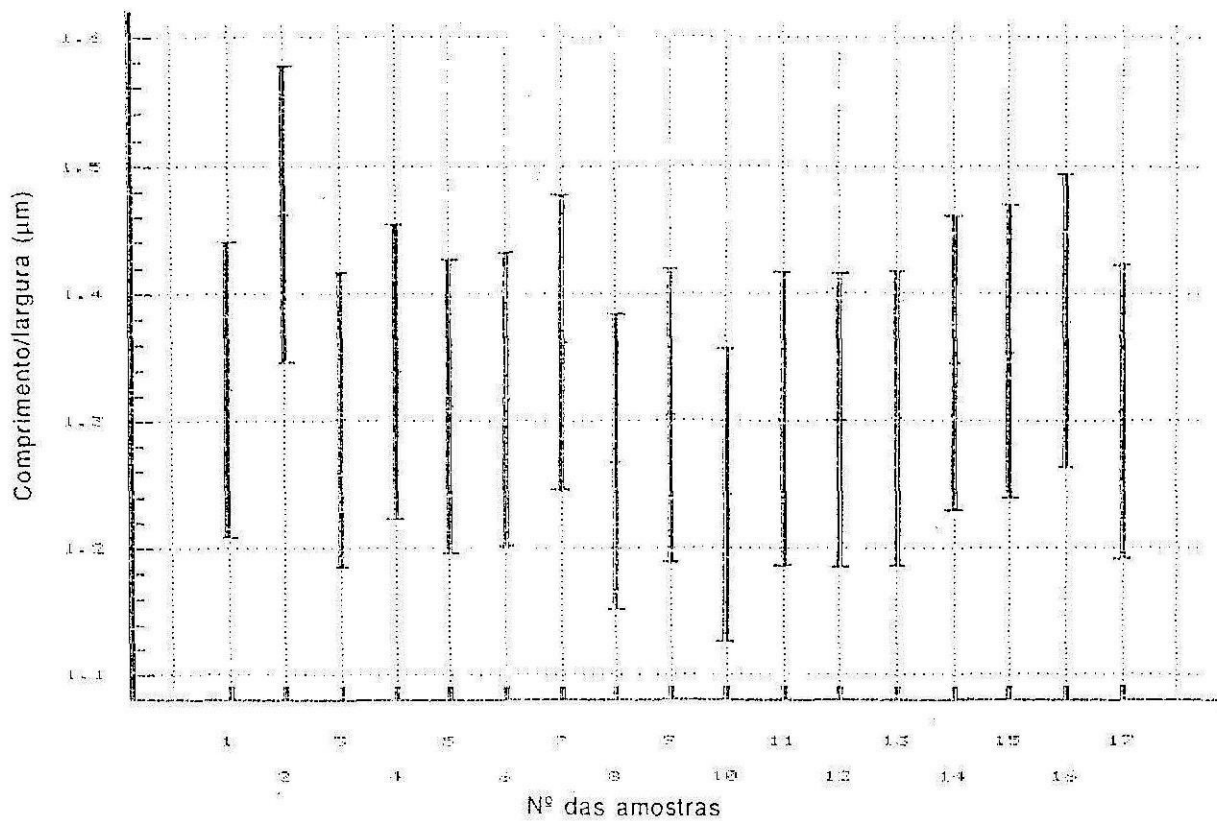


Figura 5.3 - Intervalos de confiança do quociente comprimento/largura dos conídios ($p \leq 95\%$, Scheffé). Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2.

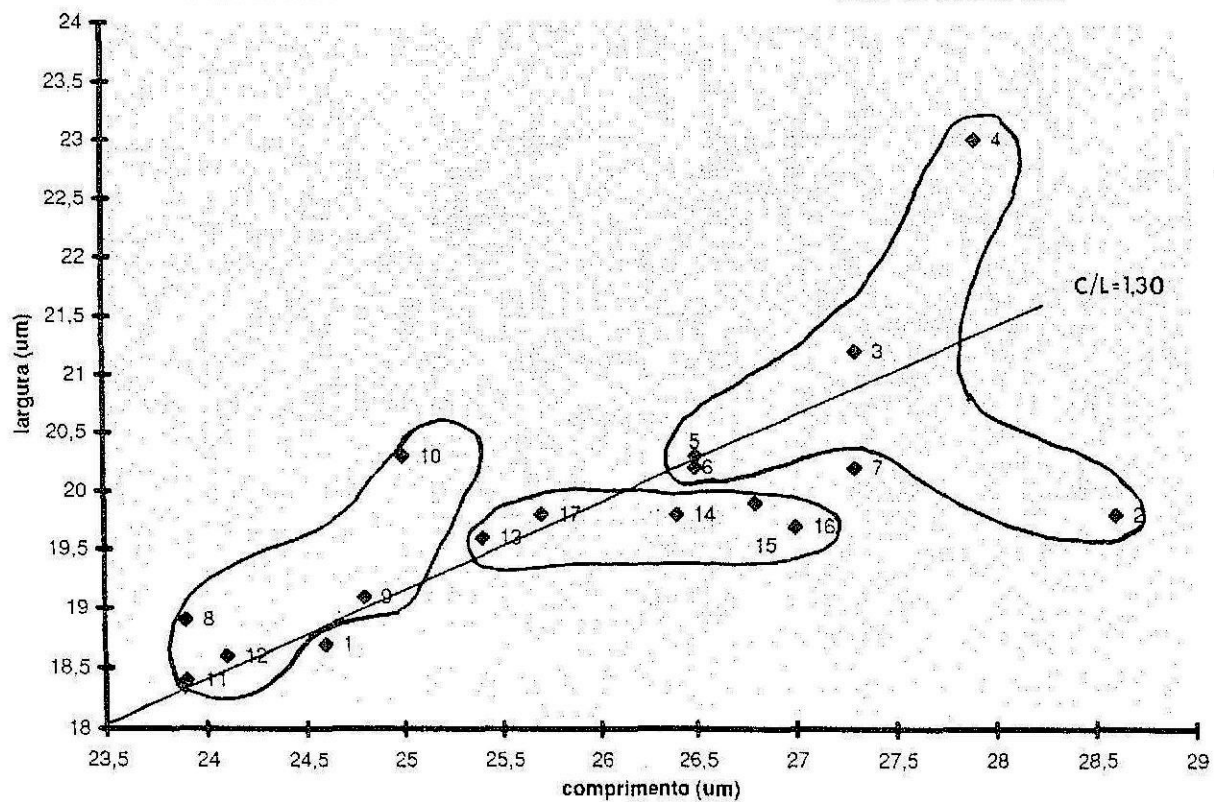


Figura 5.4 - Gráfico representando as médias de comprimento versus largura dos conídios. Os números 1 a 17 referem-se aos isolamentos como estão descritos no Quadro 5.2. Os 3 grupos de isolamentos referem-se aos três grupos de testagem.

A Figura 5.4 representa graficamente cada um dos 15 isolamentos em função da largura e do comprimento dos conídios. O afastamento da origem indica aumento da largura ou do comprimento e por isso da dimensão dos conídios. A aproximação do eixo das ordenadas ou das abcissas indica variação na relação comprimento/largura ou seja da forma dos conídios. A recta $y=0,77x$ representa o conjunto de todos os isolamentos com relação comprimento/largura de 1,30. Os isolamentos situados acima desta recta têm forma mais arredondada e os localizados abaixo da recta forma mais alongada. Assim, observando a figura, as amostras nº3 (P503), nº4 (P504) nº8 (P507) e nº10 (P509) são mais arredondadas e as amostras nº2 (P502), nº7(P502), nº14 (P513), nº15 (P514) e nº16 (P515) são mais alongadas. Os três grupos de testagem aparecem individualizados sem sobreposição ao longo da recta. Isto mostra que as condições de teste influenciam o tamanho, mas não a forma de conídios. Logo, como nas observações efectuadas as principais diferenças entre os isolamentos foram sempre de tamanho e não da forma e é provável que tenha havido diferença de condições de meio, quase que pode concluir-se que todos os isolamentos têm conídios da mesma forma e tamanho. Isto é, as diferenças encontradas teriam sido sempre devidas ao meio (ou idade) e não ao isolamento. Como estatisticamente não foi possível provar isto, a conclusão tem que ser colocada sobre reservas.

Conclusões



6 - CONCLUSÕES

O presente trabalho permitiu fazer uma caracterização morfológica interessante dos isolamentos portugueses do *P. parasitica*, como atestam os resultados apresentados nos capítulos 3, 4 e 5.

Conseguiram-se avanços metodológicos para a observação e fotografia do fungo. Esta conclusão é suportada pelas fotografias dos conidióforos, conídios e oósporos presentes nos capítulos 3 e 4, que ilustram a importância da metodologia utilizada na preparação do material.

A morfologia dos isolamentos do *P. parasitica* está de acordo com as descrições encontradas na bibliografia excepto o isolamento P509 de Vila Real que, para além dos conídios de formas normais elípticas e circulares, apresentou formas anormais de "sapatos". Das figuras apresentadas em 3.3.2 pode concluir-se que a formação destes conídios se deu em 4 fases:

- 1ª - desenvolvimento dum "bico" na extremidade dos conídios;
- 2ª - arredondamento das extremidades;
- 3ª - expansão das partes arredondadas adquirindo formas maiores, assemelhando-se a "sapatos";
- 4ª - alongamento das formas maiores (Figuras 3.24 e 3.25) e por vezes a sua bifurcação (Figura 3.26).

As hipóteses aventadas para o aparecimento deste fenómeno foram mutação, contaminação com fungos do género *Phytium* ou *Phytophthora* (Crute, comunicação pessoal) ou condições do meio. Para se obter respostas com credibilidade científica, seria necessário desenvolver técnicas apropriadas para identificar as condições do meio que influenciam a produção de esporos anormais e pesquisar com os meios adequados, a possível mutação ou contaminação.

O estudo do acasalamento dos 15 isolamentos portugueses de *P. parasitica* revelou uma variabilidade interessante. Encontraram-se isolamentos auto-compatíveis e os dois tipos de acasalamento P1 e P2 definidos por Sherriff e Lucas (1989b), situação semelhante à detectada no Reino Unido pelos mesmos investigadores. A ocorrência dos dois tipos de acasalamento permite uma fácil recombinação genética, o que é importante para a diversidade patogénica da população de *P. parasitica* (Williams, 1989).

A coexistência no mesmo campo de brássicas de isolamentos homotáticos e heterotáticos de *P. parasitica*, foi uma realidade na Batalha e Condeixa-a-Nova. Estes locais são indicados para testes de avaliação (screenings) de colecções de germoplasma (Williams, 1989), muito importantes para trabalhos de melhoramento nas crucíferas em geral e em particular nas brássicas.

Os aspectos morfológicos como a forma e dimensão dos conídios não ajudaram a caracterizar os isolamentos. A forma é constante e o tamanho varia por efeito do meio. Assim, o mesmo isolamento produziu conídios de tamanho diferente em 3 repetições. Não há correlação entre a forma, a origem geográfica e o tipo de acasalamento. A forma dos conídios, parece ter pouco interesse como método de caracterização dentro da mesma espécie de hospedeiro. Os isolamentos portugueses parecem não apresentar diferenças morfológicas, ficando as diferenças de tipo de acasalamento e a possibilidade de eventuais diferenças do tipo genético e/ou fisiológico. Para esclarecer estas diferenças, o trabalho poderá desenvolver-se com: estudo da resistência dos 15 isolamentos ao fungicida contendo metalaxil; testes de avaliação (screenings) com vários hospedeiros do género *Brassica* dos fenótipos da interacção das formas homotáticas encontradas; determinação dos fenótipos da interacção dos 15 isolamentos com inoculações em *Brassica oleracea* var. *trunchuda* proveniente de várias regiões de Portugal.

Bibliografia

7 - BIBLIOGRAFIA

- Agrios, G. N., 1978. *Plant Pathology*. 2nd edn. Academic Press. London. 703 pp.
- Alexopoulos, C. J. & Mims, C. W., 1979. *Introductory Mycology*. 3rd edn. Wiley. Chichester.
- Anónimo, 1968. *Rev. Applied Mycology*. Plant Host-Pathogen Index to Volumes 1-40 (1922-1961). 830 pp. (*cit in*: Channon, 1981).
- Butler, E. J., 1949. *Plant Pathology*. McMillan. London. (*cit in*: Channon, 1981).
- Câmara, E. de S., 1946. *Agronomia Lusit.* 8:40. (*cit in*: Lucas & Dias, 1976).
- Channon, A. G., 1981. Downy mildew of Brassicas. In: Spencer, D.M. (ed.). *The downy mildews*. Academic Press. London: 321-339.
- Carlile, M. J. & Watkinson, S. C., 1995. *The Fungi*. Academic Press. London. 482 pp.
- Carvalho, M. T., 1995. *Caracterização da resistência genética ao míldio das crucíferas (*Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.) em couve tronchuda*. Tese de mestrado. ISA. Lisboa. 82 pp.

- Chang, C., Bowman, J. L., DeJohn, A. W., Lander, E. S. & Meyerowitz, E. M., 1988. Restriction fragment length polymorphism linkage map for *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of National Academic Sci. USA* **86**: 6856-6860.
- Chang, I. H., Xu, R. F. & Chiu, W. F., 1963. *Acta of Phythopatology Sinica*. **6**: 153-162. (*cit in*: Channon, 1981).
- Chang, I. H., Shih, N. L. & Chiu, W. F., 1964. A preliminar study on the physiological differentiation of the downy mildews (*Peronospora parasitica* (Pers.)Fr.) of chinese cabbage and other cruciferous crops in the vicinity of Peking and Tientsin. *Acta Phytopat. Sinica* **7**:43-44.
- Chiu, W. F., 1959. *Bulletin of Agricultural Science (China)* **9**: 314-315. (*cit in*: Channon, 1981).
- Chorin, M., 1946. *Palest. J. Bot. Rehovot Ser.* **5**: 258-259. (*cit in*: Channon, 1981).
- Chou, C. K., 1970. An electron-microscope study of host penetration and early stages of haustorium formation of *Peronospora parasitica* (Fr.)Tul. on cabbage cotyledons. *Annals of Botany* **34**: 189-204.
- Chu, H. T., 1935. *Annals of the Phytopatological Society of Japan* **5**:150-157. (*cit in*: Channon, 1981).
- DaCosta, M. E. A. & DaCâmara, E. de S., 1954. *Portu. Acta Biol.* **4**: 162-176. (*cit in*: Channon, 1981).
- Darpoux, H., 1945. *Annls. Épiphyt. N. S.* **11**: 71-103. (*cit in*: Channon, 1981).
- Davison, A. D., Vaughan, E. K. & Hikida, R., 1962. Downy mildew of broccoli in the Pacific Northwest. *Plant Disease Reporter* **42**: 656-662.
- Davison, E. M., 1968a. Cytochemistry and ultrastructure of hyphae and haustoria of *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.. *Annals of Botany* **32**: 613-621.
- Davison, E. M., 1968b. Development of sporangiophores of *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.. *Annals of Botany* **32**: 623-631.
- DeBary, A., 1863. Recherches sur le développement de quelques champignons parasites. *Ann. sci. nat. Botan.*, Ser. IV, **20**: 5-148. Plates 1-13.

- DeBruyn, H. L. G., 1937. Heterothallism in *Peronospora parasitica*. *Genetica* **19**: 553-558.
- DeCarvalho, T., 1948. *Colónia de Moçambique*. Repartição de Agricultura. Secção de Micologia. Lourenço Marques.
- Dias, M. R. de S. & DaCamara, E. de S., 1953. *Agronomia Lusit.* **15**: 17-37.
- Dias, J. C. S., 1992. *Taxonomia das couves galaico-portuguesas utilizando caracteres morfológicos, isoenzimas e RFLPs*. Tese de Doutoramento. ISA, Lisboa. 181pp.
- Dias, J. C. S., Ferreira, M. E. & Williams, P. H., 1993. Screening of Portuguese cole landraces (*Brassica oleracea* L.) with *Peronospora parasitica* and *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* **67**: 135-141.
- Dickinson, C. H. & Greenhalgh, J. R., 1977. Host range and taxonomy of *Peronospora* on crucifers. *Transactions of the British Mycological Society* **69** (1): 11-116.
- Dzhanuzakov, A., 1962. *Bot Zh.* USSR **47**: 862-866. (*cit in*: Channon, 1981).
- D'Ercole, N., 1975. *Inftore Fitpatol.* **25**: 21-23. (*cit in*: Channon, 1981).
- Ehrlich, M. A. & Ehrlich, H. G., 1971. *Annual Revue of Phytopathology* **9**: 155-184. (*cit in*: Channon, 1981).
- FAO, 1992. *Yearbook Production*. Vol 46, Roma.
- Felton, M. W. & Walker, J. C., 1946. Environal factors affecting downy mildew. *Journal of Agricultural Research* **72** (2): 69-81.
- Font Quer, P., 1988. *Plantas medicinales. El Dióscorides renovado*. Editorial Labor, Barcelona. 1034 pp.
- Fraymouth, J., 1956. Haustoria of the Peronosporales. *Transactions of the British Mycological Society* **39**: 79-107.
- Gaumann, E., 1918. Uber die formen der *Peronospora parasitica* (Pers) Fr. *Beih. Bot. Centr.* **35**: 395-533.
- Gaumann, E., 1923. *Beitr. KryptogFlora Schwetz* **5**: - 1-360. (*cit in*: Channon, 1981).

- Gaumann, E., 1926. Über die spezialisierung des falsches mehltaus (*Peronospora brassicae* GM.) auf dem kohl und seiner verwandten. *Landw. Jrb. der Schweiz*. 463-468.
- Greenhalgh, J. R. & Dickinson, C. H., 1975. Differential reactions of three crucifers to infection by *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr.. *Phytopathologische Zeitschrift*. 84: 131-141.
- Gulya, T. J., Masirevic, S. & Thomas C. E., 1993. Preservation of air-dried downy mildew sporangia in liquid nitrogen without cryoprotectants or controlled freezing. *Mycological Research* 97 (2): 240-244.
- Gustavsson, A., 1959. Studies on Nordic Peronosporas. I. Taxonomic revision. *Opera Botanica* 3: 1-271.
- Hawksworth, D. L., Kirk, P.M., Pegler, D.N., Sutton, B.C. & Ainsworth, G.C. 1994. *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi*. 8th edn. C.A.B. International, Wallingford.
- Heath, M. C., 1971. Haustorial sheath formation in cowpea leaves immune to rust infection. *Phytopathology* 61: 383-388.
- Hirst, J. M. & Stedman, O. J., 1963. *Journal of General Microbiology* 33: 335-344. (cit in: Channon, 1981).
- Hiura, M. & Kanegae, H., 1934. *Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.* 13: 125-133. (cit in: Channon, 1981).
- Ikata, S., 1930. *Pl. Prot. Tokyo* 17: 6. (cit in: Channon, 1981).
- Iwata, Y., 1943. Studies on the modes of penetration of several Peronosporaceous fungi on their hosts and other plants. *Annals of the Phytopatological Society of Japan* 12: 97-108.
- Jafar, H. 1963. Studies on downy mildew (*Peronospora mattirolae* (Roumeguerre) Gaumann) on stock (*Mathiola incana* R. Br.). *New Zealand Journal of Agricultural Research* 6: 70-82.
- Jonsson, R., 1966. *Sver. Utsadesfor. Tidskr.* 76: 54-62. (cit in: Channon, 1981)
- Jenkins, J. E. E., 1964. *Plant Pathology* 13: 46. (cit in: Channon, 1981).

- Johnston, A., 1963. *A preliminary plant disease survey in Hong-Kong*. Plant Prod. and Prot. Division F.A.O., Rome. 32pp.
- Kluczewski, S. M., 1981. PhD. Thesis, University of Nottingham. (*cit in*: Sherriff & Lucas, 1989b).
- Kluczewski, S. M. & Lucas, J. A., 1982. Development and physiology of infection by the downy mildew fungus *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.)Fr. in susceptible and resistant *Brassica* species. *Plant Pathology* **31**: 373-379.
- Kluczewski, S. M. & Lucas, J. A., 1983. Host infection and oospore formation by *Peronospora parasitica* in agricultural and horticultural *Brassica* species. *Transactions of the British Mycological Society* **81** (3): 591-596.
- Koch, E. & Slusarenko, A., 1990. *Arabidopsis* is susceptible to infection by a downy mildew fungus. *The Plant Cell* **2** (5): 437-445.
- Krober, H., 1969. *Phytopathologische Zeitschrift* **66**: 180-187. (*cit in*: Channon, 1981).
- Krober, H., 1970. *Phytopathologische Zeitschrift* **69**: 64-70. (*cit in*: Channon, 1981).
- Langdon, R. F. N., 1948. *Pap. Dep. Biol. Univ. Qld.* **2**: 9 pp. (*cit in*: Channon 1981).
- LeBeau, F. J., 1945. Systemic invasion of cabbage seedlings by the downy mildew fungus. *Journal of Agricultural Research* **71** (10): 453-463.
- Lindau, G., 1901. Hilfsbuch für das Sammeln Parasitischer Pilze. (*cit in* Koch & Slusarenko, 1990).
- Lucas, J. A., Crute, I. R., Sherriff, C. & Gordon, P. L., 1988. The identification of a gene for race-specific resistance to *Peronospora parasitica* (downy mildew) in *Brassica napus* var *oleifera* (oilseed rape). *Plant Pathology* **37** (4): 538-545.
- Lucas, M. T. & Dias, M. R. S., 1976. *Peronosporaceae Lusitaniae*. *Agronomia Lusitana* **37** (4): 281-296.
- Lund, B. M. & Wyatt, G. M., 1978. Post-harvest spoilage of cauliflower by downy mildew. *Plant Pathology* **27** (3): 143-144.
- Mangin, L., 1895. *Bull. Soc. Hist. nat. Autun* **8**:55-108. (*cit in*: Davidson, 1968a).

- Manners, J.G., 1993. *Principles of Plant Pathology*. 2nd edn. Cambridge University Press. Cambridge. 344 pp.
- McMaugh, J., 1986. *What Garden Pest or Disease is that?* (Barnes, B. edi.). Lansdowne Press. Sydney. 302 pp.
- McMeekin, D., 1960. The role of oospores of *Peronospora parasitica* in downy mildew of crucifers. *Phytopathology* **59** (5): 693-696.
- McMeekin, D., 1969. Other hosts for *Peronospora parasitica* from cabbage and radish. *Phytopathology* **59** (5): 693-696.
- Michelmore, R. W. & Ingram, D. S., 1982. Secondary homothallism in *Bremia Lactucae*. *Transactions of the British Mycological Society* **78**: 1-9.
- Moore, W. C., 1959. *British parasitic fungi*. Cambridge University Press. (cit in: Channon, 1981).
- Monteiro, A. A. & Williams, P. H., 1989. The exploration of genetic resources of Portuguese cabbage and kale for resistance to several *Brassica* diseases. *Euphytica* **41**: 215-225.
- Monteiro, A. A., 1991. O papel do melhoramento genético num sistema integrado de diversificação de hortaliças. Jornada Técnica sobre Horticultura. Córdoba. S.E.C.H. *Actas de Horticultura* **8**:15:27.
- Moss, N.A., Crute, I.R. & Lucas, J.A., 1994. Laboratory production of oospores of *Peronospora parasitica* (crucifer downy mildew) and the recovery and characterization of sexual progeny from crosses between isolates with different host specificity. *Plant pathology* **43**: 713-725.
- Nakov, B., 1968. *Rastit. Zasht.* **16**: 25-30. (cit in: Channon, 1981).
- Nakov, B., 1972. Nauchni Trud. Vissh Selskostop. *Inst. Vasil Kolarov* **21**: 109-116. (cit in: Channon 1981).
- Nam, H. G., Giraudaut, J., deu Boer, B., Moonam, F., Loos, W. D. B., Hauge, B. M. & Goodman, H. M., 1989. Restriction fragment length polymorphism linkage map of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **1**: 699-705.

- Natti, J. J., Hervey, G. E. R. & Sayre, C. B., 1956. Factors contributing to the increase of downy mildew of broccoli in New York State and its control with fungicide and Agrimicyn. *Plant Disease Reporter* **40**: 118-124.
- Natti, J. J., 1958. Resistance of broccoli and other crucifers to downy mildew. *Plant Disease Reporter* **42**: 656-662.
- Natti, J.J., Dickson, M.H. & Atkin, J.D., 1967. Resistance of *Brassica oleracea* varieties to downy mildew. *Phytopathology* **57** (2): 144-147.
- Nicolas, G & Aggery, B., 1940. *Revue of Mycology N.S.* **5**: 14-19. (*cit in*: Channon, 1981).
- Paul, V. H. & Klodt-Bussmann, E., 1993. First results from simple methods of preservation of *Peronospora parasitica*. *Bulletin-OILB-SROP* **16**: 25-28.
- Pinckard, J. A., 1942. *Phytopathology* **32**: 505-511. (*cit in*: Channon 1981).
- Portas, C. A. & Costa, P. C., 1977. Produção, comercialização e consumo de hortícolas em Portugal Continental. *Proc. I Colóquio Nacional de Hort. e Floric.*, Lisboa.
- Preccc, T. F., Barnes, G. & Bailey, J. M., 1967. Junctions between epidermal cells as sites of apressorium formation by plant pathogenic fungi. *Plant Pathology* **16**: 117-118.
- Ramsey, G. B., 1935. *Peronospora* in storage cabbage. *Phytopathology* **25**: 955-957.
- Rodrigues Jr., C. J., 1980. *Mecanismos de resistência das plantas aos agentes patogénicos*. J.I.C.U. Centro de Investigações das Ferrugens do Cafeeiro. Oeiras. Lisboa. 67 pp.
- Rosa, E. A. S., 1992. *Glucosinolatos em couves. Estudo sobre a sua variação ao longo do ciclo cultural*. Tese de Doutoramento. UTAD, Vila Real. 260pp.
- 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*. *Transactions of the British Mycological Society* **62**: 323-332.

- Satou, M. & Fukumoto, F., 1993. Preservation of conidia of broccoli downy mildew fungus with cryogenic protectants by freezing at -80°C. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **59** (5): 492-499.
- Serafim, F. J. D. & Serafim, M. C., 1968. *Lista de doenças de culturas de Angola*. Instituto de Investigação Agronómica de Angola. Nova Lisboa. 22 pp.
- Sherriff, C. & Lucas, J. A., 1987. Variation in host specificity in the *Brassica* population of *Peronospora parasitica*. In: *Genetics and Plant Pathogenesis* (eds. Day, P. R. & Jellis, G. J.). Blackwell Scientific Publications. Oxford: 333-335.
- Sherriff, C. & Lucas, J. A., 1989a. Cytogenetic study of heterothallic and homothallic isolates of *Peronospora parasitica*. *Mycological Research* **92** (3): 302-310.
- Sherriff, C. & Lucas, J. A., 1989b. Heterothallism and homothallism in *Peronospora parasitica*. *Mycological Research* **92** (3): 311-316.
- Sherriff, C. & Lucas, J. A., 1990. Development and physiology of infection by the downy mildew fungus *Peronospora parasitica* (Pers. ex Fr.) Fr. in susceptible and resistant *Brassica* species. *Plant Pathology* **31**: 373-379.
- Shiraishi, M., Sakamoto, K., Asada, Y., Nagatani, T. & Hidaka, H., 1975. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **41**: 24-32. (*cit in*: Channon, 1981).
- Smith, I. M., Duncz, J., Phillips, D. H., Lelliot, R. A. & Archer, S. A., (eds.) 1988. *European Handbook of Plant Diseases*. Blackwell Scientific Publications. Oxford. London: 218-220.
- Sousa, M. E., Dias, J. S. & Monteiro, A. A., 1994. Screening Portuguese cole landraces for resistance to seven indigenous downy mildew isolates. Abstracts-XXIVth International Horticultural Congress, Kyoto, Japan. p 77.
- Spencer, D.M., 1981. *The downy mildews*. Academic Press. London. 640 pp.
- Thind, K. S., 1942. *J. Indian Botany Soc.* **21**: 197-215. (*cit in*: Channon, 1981).
- Thung, T. H., 1926. *Peronospora parasitica* (Pers.) De Bry. attacking cabbage heads. *Phytopathology* **16**: 365-366.

- Tsu, H. T., 1936. Studies on the penetration and haustoria of downy mildew of Cruciferous vegetables. *Journal of Agric. Association of China* **148**: 17-46.
- U. N., 1935. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. Napus* and peculiar mode of fertilization. *Japan Journal of Botany* **7**: 389-452.
- University of California, 1994. *Integrated pest management for cole crops and lettuce*. University of California, Statewide Integrated Pest Management Project. Division of Agri. and National Resources. Publi. 3307. 112 pp.
- Vaughan, J.G., 1977. A multidisciplinary study of the taxonomy and origin of *Brassica* crops. *Bio Science*, **27** (1): 35-40.
- Wager, H., 1889. On the nuclei of *Peronospora parasitica*. *Annals of Botany* **4**: 127-146.
- Wager, H., 1900. On the fertilization of *Peronospora parasitica*. *Annals of Botany*, **14**: 263-279.
- Wang, T.M., 1944. Physiologic specialization in *Peronospora parasitica* (Pers.) de Bary, reaction on hosts. *Chinese Jour. Sci. Agr.* **1**: 219-257.
- Wang, T. M., 1949. Studies on the mechanism of resistance of cruciferous plants to *Peronospora parasitica*. *Phytopathology* **39** (7): 541-547.
- Webster, J., 1980. *Introduction to fungi*. Cambridge University Press. Cambridge. 415 pp.
- Williams, P.H., 1985. *Crucifer genetics cooperative resource book*. University of Wisconsin. Madison. 124 pp.
- Williams, P.H., 1989. Screening for resistance to diseases. In: Brown, A.H.D., Frankel, O.H., Marshall, D.R. & Williams, J.T. (eds.), *The use of plant genetic resources*. Cambridge University Press. Cambridge. 335-352.
- Yerkes, W. D. & Shaw, C. G., 1959. Taxonomy of the *Peronospora* species on *Cruciferae* and *Chenopodiaceae*. *Phytopathology* **49**: 499-507.
- Yarwood, C. E., 1937. The relation of the diurnal cycle of sporulation on certain downy mildews. *Journal of Agricultural Research* **54** (5): 365-373.

- Yoshida, K., Matsumoto, I & Ohguchi, T., 1993. A comparative histochemical observation on infection behaviour of Japanese radish and shepherd's purse downy mildew fungi in Japanese root tissues. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **59** (2): 163-170.
- Yoshida, K. & Ohguchi, T., 1994. Suppression of haustorium formation of *Peronospora parasitica* in Japanese radish root tissues pretreated with inhibitors of calcium ion dependent mechanism. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* **60** (2): 253-256.