

ESPECIALIZAÇÃO FISIOLÓGICA EM FUNGOS FITOPATOGÊNICOS, SUAS ORIGENS E IMPLICAÇÕES

(*) GERALDO M. CHAVES

1. Conceito de Especialização Fisiológica

Segundo Wolf e Wolf (71), o conceito de que existem diferenças fisiológicas entre os membros constituintes de uma mesma espécie de fungo tem sua origem, provavelmente, na bacteriologia. Nos primeiros anos daquela ciência, existiam duas escolas de pensamentos opostos, uma defendendo a hipótese monomórfica e a outra a hipótese polimórfica ou pleomórfica. Os adeptos da escola monomórfica defendiam a imutabilidade das espécies; os adeptos da hipótese pleomórfica acreditavam na variabilidade dos caracteres morfológicos e fisiológicos.

Foi Schroeter (52) quem sugeriu, pela primeira vez, a especialização fisiológica em fungos. Baseou-se em suas observações de que *Puccinia graminis*, atacando trigo, não era capaz de produzir infecção, quando inoculada em outras gramíneas tais como centeio, aveia, timóteo, etc.; nas mesmas condições ambientais, o trigo era rapidamente infetado. De modo semelhante, *Puccinia graminis*, de qualquer das outras gramíneas, produzia infecção na espécie do suscetível do qual o inóculo era coletado; mas as inoculações cruzadas davam sempre resultados negativos. Trabalhos da mesma natureza conduzidos por Eriksson (18), levaram-no a dividir *Puccinia graminis* em grupos denominados "formae specialis" como, por exemplo, *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*, *Puccinia graminis* f. sp. *avenae*, *Puccinia graminis* f. sp. *secalis*, etc. Eriksson demonstrou também que subdivisões semelhantes podiam ser feitas com *P. glumarum*, *P. dispersa* e *P. coronata*. A êsse agrupamento dentro das espécies têm sido empregadas várias denominações como formas biológicas,

(*) Professor de Fitopatologia — Escola Superior de Agricultura — Viçosa — Minas Gerais.

raças biológicas, formas fisiológicas, espécies fisiológicas, raças fisiológicas, raças parasíticas, variedades especializadas, etc. Presentemente, são consideradas como variedades, tomando-se por base, principalmente, o comportamento patogênico. Alguns micologistas consideram difícil o estabelecimento de variedades entre fungos patogênicos como *Puccinia graminis*, na base de diferenças morfológicas. Por outro lado, outros autores, baseando-se em pequenas diferenças morfológicas, julgam conveniente o emprêgo de nomes de variedades.

Segundo Stakman e Harrar (61), existem pelo menos seis variedades distintas de *Puccinia graminis*, na América do Norte, que diferem no tamanho dos uredosporos e em seus espectros de suscetíveis. Embora os uredosporos de tôdas as variedades tenham algumas características em comum, as diferenças entre algumas variedades são bastante pronunciadas, permitindo que sejam identificadas por simples inspecção microscópica. O quadro seguinte fornecido por Stakman e Harrar (61), exemplifica as principais diferenças entre as variedades de *Puccinia graminis*.

TAMANHO DOS UREDOSPOROS E ESPECTRO DE SUSCETÍVEIS DE SEIS VARIEDADES DE PUCCINIA GRAMINIS

Variedades	Tamanho dos uredosporos (micra)	Plantas suscetíveis
1. tritici	32 x 20	Trigo, cevada e muitas gramíneas silvestres
2. secalis	27 x 17	Centeio, cevada e muitas gramíneas silvestres
3. avenae	28 x 20	Aveia e gramíneas silvestres
4. phleipra-tensis	24 x 17	Timóteo e certas gramíneas silvestres
5. agrostidis	22 x 16	Espécies de <i>Agrostis</i>
6. poae	19 x 16	<i>Poa pratensis</i> e outras espécies correlatas

Raças são conhecidas dentro das variedades *tritici*, *avenae* e *secalis*. Embora possam ocorrer pequenas diferenças morfológicas entre as raças de cada variedade, as diferenças mais importantes dizem respeito à patogenicidade para certas variedades de trigo, aveia e centeio, respectivamente. As raças das variedades *tritici* e *avenae* são identificadas de acôrdo com as reações que provocam em variedades diferenciais, escolhidas, entre centenas prèviamente ensaiadas para êsse mister.

Pelo menos no caso das ferrugens, a especialização fisiológica não se limita à existência de variedades (formae specialis) e de raças (56). Há evidência de que o grupo de indivíduos denominado de raça é formado, em alguns casos, por sub-grupos, originalmente denominados de biótipos por Stakman (53). Aliás, o termo biótipo, como estabelecido posteriormente, passou a ter significado diferente e muito mais preciso. Este termo envolve identidade genética dentro de uma população e deve ser aplicado sòmente a isolamentos ou indivíduos cuja identidade e pureza genética sejam estabelecidas com segurança; é a menor unidade morfológica dentro de uma espécie. Um uredosporo, por exemplo, é um biótipo. Muitas raças de *Puccinia graminias* var. *tritici* têm sido subdivididas. As raças 15 e 59 constituem exemplos magníficos. A raça 15, descoberta em 1918, nos Estados Unidos, ataca 11 das 12 variedades diferenciais de trigo empregadas para identificação das raças de *P. graminis tritici*. Quando estudava comparativamente coletas da raça 15, dos E.U. e do Japão, Stakman (53), constatou que os isolamentos japoneses eram mais virulentos que os norte-americanos; ficou evidenciado, portanto, que a raça 15 compreendia, pelo menos, dois biótipos. O isolamento do Japão foi denominado de 15 A. Em 1937 foi obtido um isolamento que era mais virulento, em algumas variedades diferenciais, do que o isolamento prèviamente estudado, sendo denominado de 15 B. Embora as diferenças entre os isolamentos 15 e aquêles posteriormente denominados de 15 A e 15 B fôssem permanentes, não foram julgados suficientes para justificar a ereção de duas novas raças, por se basearem apenas no grau de suscetibilidade de algumas variedades de trigo. Como o isolamento 15 B foi reconhecido como uma ameaça em potencial à cultura do trigo, no hemisfério americano do norte, foram intensificados os estudos sôbre o assunto, procurando-se variedades de trigo que pudessem servir para distinção mais clara entre 15 e 15 B. A variedade Rival e o híbrido Kenya x Gular provaram ser satis-

fatórios. Finalmente, a nova variedade Lee portou-se altamente resistente à raça 15 e completamente suscetível à raça 15 B, sendo adotada como novo indicador para distinguir perfeitamente os dois isolamentos, na base de resistência e suscetibilidade, em vez de apenas graus de resistência. Os isolamentos 15 A e 15 B, originalmente denominados de sub-raças, são hoje considerados como raças. Assim sendo, é possível que muitos isolamentos de comportamento idêntico em relação a um grupo de variedades possam ser diferenciados se forem encontrados indicadores biológicos adicionais. Pequenas diferenças, mesmo em uma única variedade diferencial, podem fornecer indicações para diferenças mais proeminentes. Segundo Stakman e Harrar (61), alguns isolamentos da raça 15 B produzem tipo de infecção diferente nas variedades de trigo Khapli e Kentana 52. Esses isolamentos são arbitrariamente designados como 15 B-1, 15 B-2 e 15 B-3. O reconhecimento e agrupamento de biótipos em raças, para fins práticos, depende, primariamente, da obtenção de variedades diferenciais adequadas e de facilidades e recursos para estudá-los. Para o reconhecimento e agrupamento de todos os biótipos de *Puccinia graminis* var. *tritici*, seria necessário que tôdas as variedades de trigo, cevada e muitas gramíneas fôssem inoculadas, em várias combinações de condições ambientais, com amostragens adequadas de coleções de ferrugens de todo o globo terrestre; e, enquanto essa tarefa insana estivesse sendo realizada, numerosos biótipos novos haveriam sido produzidos por mutação, hibridação ou por outros tipos de reorganização nuclear. Os trabalhos realizados com *Puccinia graminis* var. *tritici*, principalmente por Stakman e seus discípulos, na Universidade de Minnessota, servem para ilustrar a importância da classificação de biótipos dentro da categoria taxonômica de um patógeno e as dificuldades que a tarefa envolve. O problema apresenta-se também complexo no caso de outras ferrugens, carvões e vários organismos fitopatogênicos.

Phytophthora infestans, incitante da mela da batata e do tomateiro, é outro fungo fitopatogênico ao qual tem sido dedicado um grande número de trabalhos. A primeira evidência de especialização fisiológica nesse fitopatógeno foi constatada por Giddigs e Berg (21), em 1919. Esses autores, conduzindo ensaios de inoculação cruzada, descobriram que os isolamentos oriundos de batata, quando inoculados sobre o tomateiro, produzem manchas apenas nas folhas mais velhas das plantas, ao passo que isolamentos de tomateiro,

inoculados sobre batatas, produziam sintomas típicos da enfermidade. Daí o emprêgo dos termos "raça da batata" e "raça do tomateiro". Com a intensificação e o progresso dos trabalhos de melhoramento da batata, foram descritas raças fisiológicas entre a "raça da batata"; o mesmo ocorreu em relação à "raça do tomateiro". De acôrdo com Black (1), a especialização fisiológica de *P. infestans* em batata foi reconhecida pela primeira vez na Alemanha, onde Shick, Müller e Lehman, em vários trabalhos, de 1932 a 1938, descreveram várias raças do patógeno, baseando-se nas reações de certas solanáceas silvestres e alguns híbridos.

Salaman (49), após realizar muitas investigações em busca de resistência para a mela da batata, trabalhando com híbridos interespecíficos, conseguiu clones com boas características comerciais, utilizando como fonte de resistência espécies silvestres de *Solanum demissum*. Lehman (32), em 1941, empregando nove formas hexaploides de *S. demissum*, previamente selecionadas como homozigotas para resistência ou suscetibilidade absoluta, observou que o F_1 de todos os cruzamentos era uniformemente resistente a duas raças do patógeno. As gerações do F_2 e dos retrocruzamentos com *S. demissum* suscetível, segregavam, de acôrdo com as leis mendelianas, na razão de 3:1 e 1:1, respectivamente. Assim entre as formas hexaploides de *S. demissum* parecia que a resistência às duas raças de *P. infestans* era controlada por um único gene dominante, segundo a herança mendeliana simples, modalidade típica de herança de caracteres dominantes em espécies diplóides. Black (3), em 1954, pelo cruzamento de híbridos tetraploides, obtidos a partir de híbridos de *S. demissum* (hexaploides) e *S. rybinii* (diploide), com variedades comerciais de *S. tuberosum*, conseguiu identificar quatro genes diferentes que controlavam resistência. Por retrocruzamentos sucessivos, separou êsses quatro genes de modo que diferentes raças pudessem ser identificadas. Denominou os genes de R_1 , R_2 , R_3 , R_4 . A hereditariedade de cada gene obedecia às leis de herança mendeliana simples e processava-se independentemente. Cada gene conferia resistência à raça fisiológica comum do patógeno bem como a um grupo particular de raças especializadas. Por meio de vários cruzamentos, envolvendo todos os genes, foram obtidos 16 genótipos diferentes (incluindo o recessivo). Black conseguiu identificar 10 raças *P. infestans*.

Trabalhando com um clone diferente de *S. demissum*, Mills e Peterson (35), obtiveram resultados semelhantes aos de Black. Descreveram três genes dominantes, designando-os

pelas letras B, C, e D. Obtiveram oito genótipos diferentes, por cruzamentos, e identificaram oito raças do patógeno. Da mesma forma, Mastenbrock (34) encontrou quatro genes para resistência em outro clone de *S. demissum*, designando-os R₇, R₈, R₉, e R_{2,4}. Assim, cada investigador estava empregando um simbolismo próprio, para designar genes que conferiam resistências às suas coleções particulares, não havendo muita possibilidade de correlacionar os trabalhos realizados isoladamente. A fim de solucionar o problema, Black, Mastenbrock, Mills e Peterson (2), permutaram suas coleções de suscetíveis diferenciais, para ensaiá-las com suas respectivas coleções de raças. Esse trabalho conjugado demonstrou que apenas quatro genes estavam presentes entre os três grupos de suscetíveis diferenciais. Foi proposto um sistema internacional para designar esses genes e a nomenclatura Black (1) foi adotada. As várias raças de *P. infestans* passaram a ser designadas de acordo com o genótipo do suscetível que eram capazes de infectar. A raça comum de campo, atacando apenas plantas que não possuem gene R, tornou-se raça 0 (zero). Como raça 1 foram denominados os isolamentos que podem atacar plantas portadoras do gene R₁, bem como as plantas recessivas (rr); isolamentos que atacam somente as plantas recessivas e as portadoras do gene R₄ foram designadas como raça 4, etc.. Isolamentos que atacam hospedeiros portadores de genes em combinação de dois ou mais, constituem as raças combinadas (combination races). A raça 1,3 por exemplo, é capaz de atacar, além de recessivo, as plantas portadoras de genes R₁, R₃, e R₁ R₃, mas nenhum suscetível com os outros 12 genótipos. A raça 1, 3, 4, atacaria o recessivo e as plantas portadoras dos genes R₁, R₃, R₄, R₁ R₃, R₁ R₄, e R₁ R₃ R₄, mas não atacaria nenhum dos oito suscetíveis portadores do gene R₂. Dentro desse esquema foi possível a identificação de 16 raças fisiológicas de *P. infestans*. A descoberta recente de genes de resistência diferentes dos quatro previamente caracterizados, provavelmente, possibilitará a identificação de outras raças do patógeno (20, 26, 39).

Puccinia graminis var. *tritici* e *Phytophthora infestans*, ilustram satisfatoriamente a complexidade do fenômeno da especialização fisiológica e do conceito de raça em fungos fitopatogênicos. Além do reconhecimento de raças fisiológicas pelo comportamento dos fitopatógenos em relação a suscetíveis diferenciais, outros critérios baseando-se no comportamento do organismo em meio de cultura artificial, em diferenças morfológicas ou fisiológicas, etc., que serão oportu-

namente discutidos, servem de base para caracterizar especialização fisiológica.

2. Origem das Raças Fisiológicas

Um dos aspectos mais fascinantes na apreciação do fenômeno da especialização fisiológica entre os fungos fitopatogênicos diz respeito à sua origem. Considera-se, em geral, que podem se originar por um dos seguintes processos: 1 — mutação; 2 — adaptação; 3 — hibridação; 4 — heterocariose e 5 — parassexualismo.

2.1. Mutação

Segundo Stakman (60), as mutações são extremamente comuns em muitos fungos; entretanto, um grande número de mutantes difere tão pouco de seus progenitores e de outros biótipos que a sua diferenciação se torna uma tarefa difícil. As mutações são mais comumente observadas em meios de cultura sólidos onde aparecem, em muitos casos, como setores ou manchas distintas nas colônias. Entretanto, muitos permanecem sem ser notados. Em alguns casos, devido ao meio em que aparecem não ser adequado aos seus crescimentos. Em outros porque as mutações em patogenicidade e características fisiológicas são marcadas pelo crescimento da linhagem progenitora ou ocorrem sem mutações visíveis. Podem ocorrer mutações para a maioria dos caracteres fisiológicos e morfológicos, em vários graus de magnitude. São comuns para caracteres morfológicos como cor, topografia, consistência, direção de crescimento, tipo de margem, zonação, taxa de crescimento, intensidade de esporulação, etc.. Ocorrem mutações para caracteres fisiológicos como habilidade em produzir enzimas, reações a substâncias químicas, requerimento de temperatura, etc.. Mutações para caracteres morfológicos como forma, tamanho e coloração de esporos, corpos frutíferos e estruturas de repouso.

Embora mais difíceis de serem conservadas, as mutações em patogenicidade também são relativamente comuns. É interessante notar-se que os biótipos estudados têm demonstrado maior propensão à atenuação ou perda de patogenicidade: apenas ocasionalmente tem-se observado a ocorrência do aumento de virulência.

Stakman e seus colaboradores têm dedicado um grande volume de trabalho ao estudo das mutações em fungos, prin-

principalmente com *Ustilago zea*. Um único biótipo desse fungo pode dar origem a centenas de mutações em curto período de tempo. Culturas monospóricas de *U. zea*, com grande frequência, apresentam características de coloração, topografia, etc., muito diferente dos restantes das colônias. Replicando esses mutantes para placas de Petri, verificam-se novas mutações, caracterizadas pelo aparecimento de novos setores e é necessário que se adotem precauções especiais a fim de manter-se a pureza de uma linhagem monospórica desse fungo.

Há evidência de que mutações ocorrem também sobre plantas suscetíveis, em natureza. Mutações em fungos parasitos obrigatórios, como as ferrugens, só podem ser observadas em plantas vivas e só é possível constatá-las quando determinam tipos de infecção tipicamente diferentes ou quando apresentam coloração diversa do biótipo progenitor. Nas ferrugens, apenas o estágio picnospórico é monocariótico; os estádios eciospórico, uredospórico e teliospórico são dicarióticos. Como os mutantes geralmente são recessivos, a mutação para um único fator, na fase dicariótica, pode permanecer sem ser externada, até que ocorra a homozigose em um novo híbrido dicariótico, após recombinação e segregação de fatores durante o estágio sexual. Mutantes albinos podem ser facilmente observados nos picnios. Entretanto, caracteres poderão ser externados imediatamente na fase dicariótica, se a ferrugem apresenta condição heterozigota no respectivo loci ou se ocorre dupla mutação, uma em cada locus, nos dois núcleos conjugados. Stakman, Levine e Cotter (56), estudando a raça 1 de *Puccinia graminis* var. *tritici*, mantida constante sob a forma de sucessivos cultivos do estágio uredial, reconheceram quatro mutações, distintas em patogenicidade. Dois dos mutantes diferiam tanto da raça 1, que esses autores os designaram como novas raças. Uma dessas mutações, hoje a raça 60, apresentava como caráter diferencial a habilidade de infeccionar as variedades de trigo Kubanka e Einkorn. Newton e Johnson (39), registraram um caso de mutação em *P. graminis* var. *tritici* e outro em *P. graminis* var. *avenae*. Também em outras ferrugens tem sido constatada ocorrência de mutação (56). Alguns dos mutantes eram menos virulentos que os progenitores, para algumas variedades; outros comportavam-se como mais virulentos.

As mutações em características culturais são comuns a todas as classes de fungos, mas as frequências podem

diferir, grandemente, em diferentes espécies do mesmo gênero e em biótipos dentro das espécies. Entre os fungos, as mutações são relativamente raras em *Ustilago kolleri*, *U. avenae* e *Urocystis ocutta*. Por outro lado, são extremamente comuns em *U. maydis*, *Sphacelotheca sorghi* e *S. reiliana*.

Não se conhece muito acêrca da frequência numérica de mutações em organismos fitopatogênicos mas, segundo alguns autores, devem estar dentro dos limites determinados para as plantas superiores e para os insetos.

Christensen (10) calculou a frequência de mutação em certas linhagens de *Helminthosporium sativum*, como sendo da ordem de 1:2.400 a 1:20.000, em meio de cultura artificial, dependendo das condições ambientais; em plantas vivas a taxa foi de 1:2.900.

Segundo estudos realizados por Rowell e DeVay (49), a taxa de mutação em alguns biótipos de *Ustilago maydis* é muito mais alta que em *H. sativum*. Em um biótipo de *Ustilago maydis*, 0,8% dos esporídios, derivados de um único esporídio, apresentaram-se geneticamente diferentes do original. Em um único frasco de meio líquido, existiam cêrca de 10 bilhões de esporídios, todos derivados de um único esporídio original. Trabalhando com numerosa amostragem, êsses autores constataram que 80 milhões de esporídios eram geneticamente diferentes do original. Sômente para a característica de côr foram registrados cinco diferentes tipos de mutações.

Certos açúcares e sais de metais pesados, urânio, pó-lônio e potássio, além de outras substâncias químicas, geralmente, aumentam o número de mutações visíveis. Luz ultravioleta, radiações, temperaturas altas e baixas, e algumas substâncias produzidas por bactérias, são também mutagênicas.

Rowell e DeVay (49) aumentam a taxa de mutação em linhagens haploides e diploides de *Ustilago maydis*, pela adição de nitrato de uranil radiativo, na dosagem de uma grama por litro de batata-dextrose-agar.

A estabilidade das mutações é variável. Muitas são instáveis como seus progenitores e continuam apresentando mutações. Outras permanecem constantes por algumas gerações, e, ocasionalmente, produzem novos mutantes. Algumas mutações de *Helminthosporium sativum*, cultivadas, lado a lado, com seus progenitores, na mesma placa de Petri,

em vários meios de cultura, foram mantidos constantes por longo tempo, em trabalho realizado por Christensen (10).

Pelas evidências existentes, pode-se concluir que, variantes resultantes de modificações genéticas, induzidas por fatores do meio, ocorrem tanto em meio de cultura como em plantas suscetíveis vivas.

2.2. Hibridação

Desde que Craigie (15,16,17) demonstrou a função do pínio no ciclo da vida de *Puccinia graminis* e maiores detalhes sobre os processos de reprodução sexuada, entre os fungos, tornaram-se conhecidos, uma compreensão mais precisa da variabilidade de diversos fitopatógenos tem sido possível aos fitopatologistas.

As variações devidas à hibridação são comuns e numerosas entre os fungos fitopatogênicos. Em algumas espécies, muitas recombinações genéticas podem resultar do cruzamento de diferentes biótipos, raças e variedades. Êsses cruzamentos e recombinações podem ocorrer também entre espécies e mesmo entre gêneros diferentes. A hibridação, dentro de uma mesma espécie, pode determinar o aparecimento de novos biótipos e raças, aumentando o espectro de suscetíveis de um patógeno ou a sua virulência para certas variedades de plantas.

A importância prática da hibridação em natureza é patenteada em certas espécies de ferrugens e carvões. No caso das ferrugens dos cereais, por exemplo, as variedades e as raças fisiológicas são clones dicarióticos nos quais a constituição genética permanece constante durante o estágio infeccioso (uredial), a menos que ocorra alguma mutação. Entretanto, nas espécies de ferrugens em que ocorre a fase monocariótica, as raças podem perder a identidade genética, seja pela segregação, durante a meiose, que precede a formação dos esporídios, ou pela formação de novas fases dicarióticas pelo cruzamento, ao acaso, entre monocárions compatíveis. O estágio monocariótico de *P. graminis* ocorre sobre *Berberis vulgaris* onde os esporídios do fungo dão origem à estruturas sexuais (pínios). Após a plasmogamia entre monocárions compatíveis, iniciando a fase dicariótica, são formados os eciosporos que, provocando infecção primária nos cereais, originam os uredosporos; as infecções secundárias são provocadas pelos uredosporos; Newton et

al (40), cruzando picnios individuais, originados de esporídios produzidos por diferentes raças de *P. graminis nitrici* sobre *Berberis vulgaris*, obtiveram novas raças do patógeno. Na Austrália, onde não existe o hospedeiro intermediário, segundo Waterhouse (67), ocorrem poucas raças de ferrugens do colmo do trigo. Por outro lado, nas áreas onde ocorre o *B. vulgaris*, além de existirem raças em abundância, pela recombinação e segregação de fatores para patogenicidade, podem aparecer novas raças, em natureza. Na América do Norte, por exemplo, já foram reconhecidas mais de 200 raças de *P. graminis* var. *tritici*.

Cotter e Levine (41), cruzando picnios de *P. graminis* var. *agrostidis* com *P. graminis* var. *avenae* e, em um total de 382 cruzamentos, obtiveram 35% de écios. Stakman, Levine e Cotter (56) cruzaram *P. graminis* var. *tritici* com *P. graminis* var. *agrostides*, conseguindo isolar 3 novas raças da progénie estudada. As raças assim obtidas foram denominadas "inter-formae" e, em alguns casos, exibiram patogenicidade mais acentuada que seus progenitores. Johnson et al (30) conduziram investigações semelhantes e sugeriram que tais formas híbridas podem ocorrer com frequência, em natureza.

Tisdale e colaboradores, segundo Wolf e Wolf (71), encontraram em Kansas, New México e Texas, um novo carvão do milho que, pelo seu espectro de suscetíveis e caracteres fenotípicos, apresentava evidência de ser um híbrido de *Sphacelotheca sorghi* com *S. cruenta*. Híbridos interespecíficos entre *Ustilago hordei* x *U. medians*, *U. levis* x *U. avenae* e *Tilletia levis* x *T. tritici*, têm sido produzidos experimentalmente. Ademais, cruzamentos inter-genéricos entre *Sorosporium reilianum* x *Sphacelotheca sorghi* e *S. reilianum* x *Sphacelotheca cruenta* (11, 63), têm sido obtidos.

A formação de novas raças por hibridação, entretanto, não significa que elas se perpetuarão; pelo contrário, a maioria, por falta de habilidade de subsistir como patógeno, tende a desaparecer.

2.3. Heterocariose

Segundo Hansen (24), as variações apresentadas por culturas de fungos "in vitro" nem sempre são devidas a mutações; muitos fungos, como ocorrem em natureza, embora operando com entidades definidas, são constituídos por

elementos ou indivíduos distintos. Esta condição, denominada de "fenômeno da dualidade" (dual phenomenon), ocorre com bastante frequência e envolve muitos gêneros dos fungos imperfeitos. Hansen e Smith (23), estudando o fenômeno pela primeira vez, em *Botrytis cinerea*, chegaram à conclusão de que um esporo binucleado não é um indivíduo, mas um grupo de indivíduos, ou seja, uma colônia; tal esporo poderá originar uma cultura geneticamente pura somente se os seus núcleos forem geneticamente idênticos. Aquêles autores cunharam o termo "heterocariose", originalmente, para descrever a condição de uma célula contendo dois ou mais núcleos diferentes. Hansen, (24.a) em trabalho posterior, propôs que o termo não fosse aplicado em senso tão restrito, como havia sido interpretado por alguns investigadores do assunto; de acôrdo com Hansen, heterocariose descreve uma condição e, assim sendo, o termo poderá ser empregado onde quer que a condição ocorra e não apenas a uma única célula. Assim, um fungo é heterocariótico quando contém dois ou mais núcleos de cargas genéticas diferentes em seu talo. Esses núcleos podem ocorrer isoladamente, em cada célula da hifa, ou em células multinucleadas. A variabilidade de qualquer fungo no qual ocorra a heterocariose é, potencialmente, muito grande, pois, diferentes associações de núcleos podem resultar em uma enorme variedade de genótipos, dando origem a um amplo espectro de diferentes expressões fenotípicas. Assim sendo, não é de admirar que a heterocariose tenha sido invocada para explicar muitas expressões diferentes de variabilidade em fungos; entretanto, o fenômeno não deve ser superestimado, como tem freqüentemente ocorrido; a afirmação da condição heterocariótica de um isolamento requer comprovação por evidência citológica. Algumas espécies de *Helminthosporium* servem para ilustrar não só a necessidade da evidência citológica bem como o perigo da generalização do fenômeno, ainda que se trate de espécies do mesmo gênero. Algumas espécies de *Helminthosporium* possuem esporos multinucleados que poderiam ser heterocarióticos pelo fato dos núcleos de cada esporo não parecerem ser derivados de sucessivas divisões mitóticas de um único núcleo genitor (22). Por outro lado, outros possuem conidióforos uninucleados, uma característica que parece evidenciar a existência de um único tipo genético de núcleo nos esporos multinucleados sustentados por êsses conidióforos (47). Além disso, em *H. sativum* apenas uma das células do esporo multinucleado dá origem ao tubo germinativo (27); assim, pouco importa se o esporo é heterocariótico,

pois, seria muito difícil que fôsse capaz de, isoladamente, dar origem a um micélio heterocariótico.

Em *Fusarium*, alguns esporos são uninucleados, enquanto outros são multinucleados mas não heterocarióticos, pois, seus núcleos são todos derivados de um único núcleo genitor (5).

De acôrdo com Hansen e Sneider (25), a condição heterocariótica pode ser iniciada por mutação dentro de uma entidade multinucleada e por fusão ou anastomose entre células contendo núcleos de cargas genéticas diferentes. Assim, o fato da maioria das células do micélio de um fungo serem uninucleadas não o impede, necessariamente, de agir como um heterocáron. Os núcleos de duas ou mais raças de fungos que se fundem para formar um heterocáron, migram pelas pontes de hifas formadas durante a anastomose, mesclando-se. Ademais, é muito provável que, em alguns fungos, essa mescla seja muito mais extensa, pela multiplicação dos núcleos em proporções diferentes e pela movimentação de célula em célula, através da perfuração dos septos. A migração nuclear é fenômeno bem estudado em *Rhizoctonia solani* e outros fungos (52,28).

Quando dois tipos de núcleos ocorrem em um heterocáron cada um deve conter o alelo normal do gene mutante do outro, de modo que o heterocáron tenha um complemento total de alelos, embora em diferentes núcleos, e possa crescer normalmente. A possibilidade de que os heterocárions possam expressar essa espécie de vigor híbrido em seu parasitismo foi estudado por Buxton (6), em *Fusarium oxysporum f. pisi*. Buxton trabalhou com dois isolamentos da raça patogênica 1, capazes de atacar a variedade de ervilhas Orward. Tomou milhares de conídios desses isolamentos, irradiou-os com luz ultravioleta e classificou as colônias resultantes, de acôrdo com suas modificações em virulências e exigências nutritivas, quando cultivadas em meio de agar. Alguns dos mutantes permaneceram tão virulentos como as raças genitoras, mas vários mostraram-se muito menos patogênicos. Quando heterocárions sintetizados a partir de pares de culturas praticamente avirulentas foram ensaiadas em ervilhas, comportaram-se com tanta virulência quanto os tipos originais. Baseando-se nessas evidências, Buxton sugere que aumentos em virulência, semelhantes a êsse produzido experimentalmente, também possam ocorrer em natureza. Essas novas raças virulentas poderiam originar-se por fusões ao acaso, entre duas raças originalmente de baixa virulência.

Nelson (37), tomou uredosporos de duas raças da ferrugem do côlmo do trigo, mistouru-os e inoculou-os em variedades de trigo, selecionadas de acôrdo com a resistência ou suscetibilidade apresentada. Em um de seus ensaios, no qual havia utilizado uredosporos da raça 11 (vermelho pardo) misturados com os da raça 121 (cinza pardo), obteve um isolamento alaranjado que era altamente virulento a uma variedade de trigo originalmente resistente à raça 11. Alguns dos novos biótipos, que se originaram das misturas, possuíam 3 núcleos no uredosporo, em vez de 2, como ocorre normalmente, e, após seis gerações do estágio uredial, segregaram para as raças progenitoras. Como base nessas observações, é razoável supor-se que heterocárions se formaram entre as duas raças. Ademais, maiores evidências sôbre o assunto foram fornecidas por Wilcoxson et al (69), demonstrando que tubos germinativos de uredosporos, germinando sôbre as fôlhas do trigo, fâcilmente se anastomosam.

Êsses exemplos mostram que a heterocariose pode ser um fator importante na modificação da patogenicidade dos fungos. Porém, sem que haja mutação, é impossível a ocorrência de mudanças hereditárias através da heterocariose, a menos que haja também recombinação genética. Pontecorvo e colaboradores (41, 42, 43, 45), entretanto mais recentemente, mostraram que um sistema de recombinação genética pode ocorrer dentro de heterocárions, como será discutido, em seguida.

2.4. Parasexualismo ou recombinações mitóticas

Pontecorvo e seus colaboradores, além de Buxton e outros pesquisadores, têm conduzido estudos sôbre genética de fungos, que estão abrindo novos horizontes para geneticistas e fitopatologistas.

Estudando segregação mitótica em duas raças de *Aspergillus nidulans*, Pontecorvo et al. (43) fizeram-nas igualmente diplóides e heterozigotas para seis genes indicadores (gene markers), em diferentes arranjos aos pares e demonstraram que dois processos podem ocorrer:

- a — distribuição irregular de cromossomos inteiros durante a mitose, determinando a presença de núcleos haplóides com genes indicadores recombinantes em diferentes cromossomos;

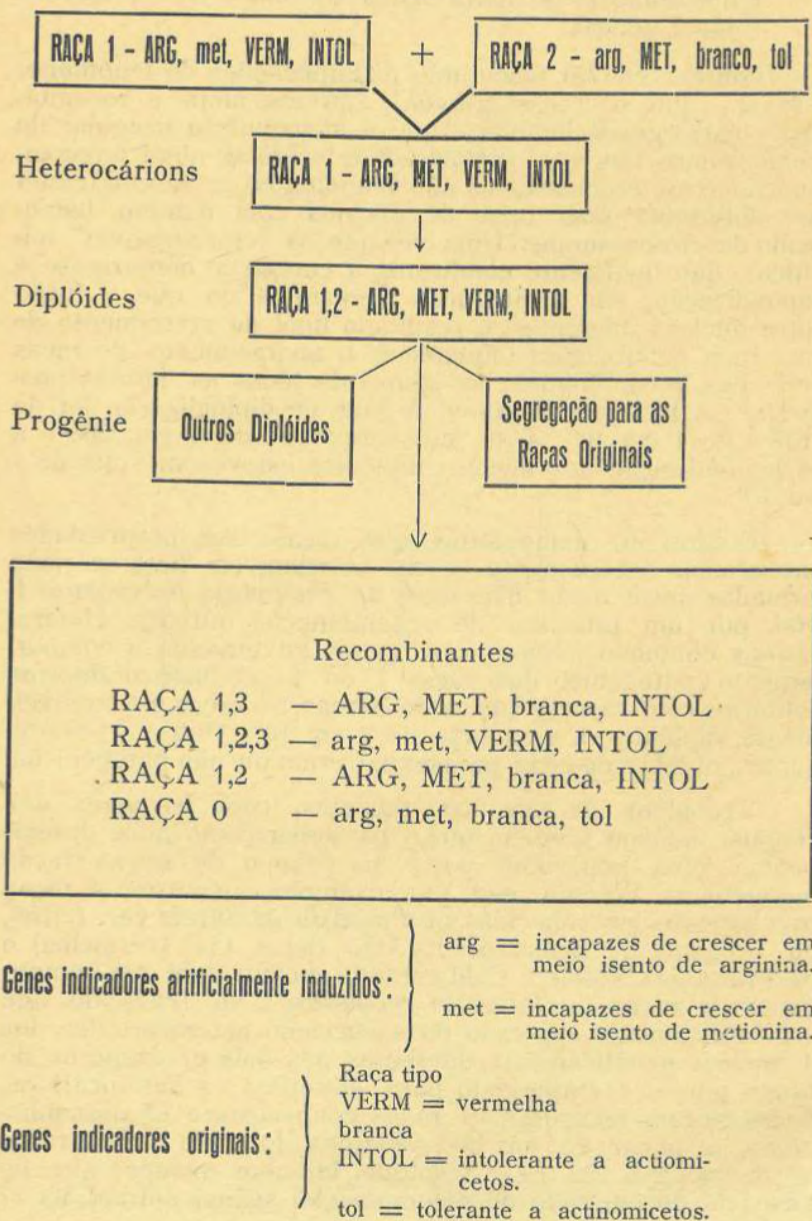
b — “crossing-over” mitótico conduzindo a núcleos diplóides, nos quais a homozigose para um gene indicador determina homozigose para todos os alelos a ele ligados (linked genes).

Pontecorvo (45), discutindo as implicações do fenômeno, assevera que o “crossing-over” mitótico afeta a recombinação entre genes ligados e que a distribuição irregular de cromossomos nas raças diplóides heterozigotas afeta a recombinação entre cromossomos não homólogos, ao mesmo tempo que determina uma taxa de núcleos com número balanceado de cromossomos. Uma vez que os “crossing-over” mitóticos, que finalmente conduzem à completa homozigose e haploidização, são muito mais frequentes do que a fusão entre núcleos diferentes, o resultado final do crescimento de uma raça heterozigota diplóide é o aparecimento de raças haplóides, recombinação dos genes de tôdas as formas possíveis, em loci heterozigotos. A taxa de diploidização foi da ordem de 1 em 10^6 , a de “crossing-over” de 1 em 500 e a de haploidização dos núcleos diplóides esteve em volta de 1 em 10^3 .

Buxton (6) demonstrou que raças com propriedades patogênicas inteiramente novas ocorriam em heterocárions formados entre raças diferentes de *Fusarium oxysporum* f. *pisi*, por um processo de recombinação mitótica. Heterocárions contendo núcleos com genes governando o comportamento patogênico das raças 1 ou 2 produziram núcleos solitários com características de ambas as raças, presumivelmente diplóides, a uma taxa de 3 em 10^8 . Outros recombinantes, obtidos do ciclo parasexual, eram ou não patogênicos.

Trabalhos de pesquisa recentes, com ferrugens dos cereais, indicam também que o parasexualismo pode desempenhar uma importante parte na origem de novas raças patogênicas. Watson (68), por exemplo, encontrou 4 raças previamente desconhecidas de *Puccinia graminis* var. *tritici*, na progênie de heterocárions das raças 111 (vermelha) e Nr-2 (laranja). Vakili e Caldwell (64) encontraram um número maior de raças de *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* do que era teoricamente esperado da associação heterocariótica dos 4 núcleos geneticamente diferentes nos dois uredosporos do fungo por eles empregado para sintetizar os heterocárions. Conseguiram recuperar 16 raças conhecidas e 17 desconhecidas, a partir de um heterocárion formado pelas raças vermelhas 2 e 122. Esse resultado levou-os a supor que, na ausência de um ciclo de recombinação sexual normal, as 17

O ESQUEMA SEGUINTE SUMARIZA O TRABALHO DE BUXTON:



raças novas se originaram como resultante da recombinação somática., durante um ciclo parasexual ocorrido nos heterocátons.

Embora Pontecorvo (45), reconheça que muito mais investigações sobre o fenômeno se fazem necessárias para esclarecer se o ciclo parasexual é ou não um eficiente e frequente substituto para o ciclo normal, menciona a abundância de fungos assexuais "como uma resposta fácil, mas não séria" para a questão. Ademais, assevera que a heterocariose não é apenas um mecanismo para armazenamento de variabilidade genética e para adaptação a curto prazo, mas sim uma fase importante no ciclo parasexual. Afirma também que a heterocariose, sozinha, não poderia dar origem a novas propriedades patogênicas, por recombinação.

2.5. Adaptação

Além das variações inerentes aos fungos e outros microorganismos, existe ainda a possibilidade do próprio suscetível poder desempenhar uma parte na determinação de virulência de um patógeno em potencial. Tem sido bastante estudada a adaptação das bactérias à tolerância de substâncias de crescimento. Se esse processo é relativamente comum entre as bactérias, é muito provável que ocorra também entre fungos fitopatogênicos. Realmente, existem evidências demonstrando que a adaptação pode ser um fator importante em vários aspectos da fisiologia dos fungos.

Os principais trabalhos sobre o fenômeno, em fungos, têm abordado o problema sob os aspectos da capacidade de adaptação à tolerância de toxinas, capacidade de adquirir habilidade para utilizar novas substâncias de crescimento e capacidade de adquirir ou perder patogenicidade. Estudos sobre os dois primeiros aspectos são pre-requisitos para os estudos da capacidade do organismo em perder ou adquirir patogenicidade, pois, a resistência de um suscetível a um patógeno pode ser correlacionada com a presença de alguma toxina produzida pela planta ou com ausência, nos tecidos do suscetível, de algum metabólito necessário para o crescimento do organismo invasor. Um fungo que fosse capaz de se adaptar à tolerância de toxinas ou que se tornasse capaz de se adaptar à tolerância de toxinas ou que se tornasse capaz de utilizar um novo metabólito poderia, é lógico, sobrepujar tais mecanismos de resistência. Sob esse aspecto,

o problema é complicado pela necessidade de conhecer-se com segurança a natureza da resistência ou da suscetibilidade da planta, ou seja, qual a propriedade particular do suscetível que determinaria a raça fisiológica de um fungo que seria capaz de parasitá-lo.

Antes de ser encarado o problema da adaptação para tolerância a toxinas e para patogenicidade, devem ser consideradas as possíveis explicações alternativas das modificações induzidas nos microorganismos. Existem três mecanismos principais: o primeiro, dominado por Stanier (62), de adaptação enzimática, não envolve modificação genética mas tem a ver com a habilidade do organismo em produzir um enzima específico em resposta ao estímulo do substrato do enzima. O segundo envolve mutação ao acaso, quando os organismos são expostos a certas substâncias; os mutantes mais aptos a utilizarem uma certa substância seriam favoravelmente selecionados e, como resultante, ocorreria o crescimento, dando o mesmo resultado final da adaptação enzimática. O terceiro mecanismo difere do segundo apenas em que as mutações para formas capazes de utilizarem uma dada substância seriam determinadas por exposição ao próprio substrato e não ao acaso.

A interpretação do mecanismo de adaptação é uma tarefa difícil e incerta mas o fato de certas substâncias e ambientes poderem modificar o comportamento dos microorganismos é indiscutível. O estudo da natureza de uma dada adaptação é importante, principalmente, para saber se a modificação verificada é hereditária.

2.5.1. Aquisição de tolerância a toxinas

Muitos fungos previamente incapazes de crescerem em presença de substâncias fungicidas ou de produtos de crescimento de outros microorganismos podem tornar-se capazes de fazê-lo após prolongadas exposições a essas substâncias. Stakman et al (57), por exemplo, cultivando *Ustilago zeae* em meio contendo arsênico, aumentaram sua tolerância à inibição por arsenito de sódio de 2.400ppm a 7.000ppm. Entretanto, quando as colônias voltaram a ser cultivadas em meio livre de arsênico, perderam rapidamente a tolerância adquirida. Wilson (70) chegou a resultados semelhantes, trabalhando com *Sclerotium rolfsii* e *S. delphinii*. Christensen (12) demonstrou que os isolamentos monospóricos de *Gibberella zeae* desenvolviam tolerância crescente ao verde

de malaquita, ao sublimado corrosivo e ao fosfato etilmercúrio. Infelizmente, poucos ensaios críticos têm sido feitos para explicar esses resultados; entretanto, é plausível a suposição de que, pelo menos, algumas dessas modificações sejam exemplos de adaptação enzimática. A produção de um enzima adaptativo capaz de controlar um sistema de desintoxicação poderia ser um importante fator de tolerância adquirida.

2.5.2. Mudança adaptativa da virulência de fitopatógenos.

As mudanças adaptativas não só resultam em modificações na virulência de biótipos, mas também no aparecimento de novas raças patogênicas. Desde o início do século XX, vários trabalhos têm demonstrado que esses fenômenos podem ocorrer. Ward (66), em 1903, demonstrou que a propagação em algumas espécies de *Bromus* aumentava a capacidade de isolamentos de *Puccinia dispersa* para infeccionar outras espécies do mesmo gênero dessa gramínea que eram previamente resistentes. Daí o conceito de hospedeiro pontes ("bridging hosts") formado por Ward. Salmon (50) encontrou evidência de modificações semelhantes na patogenicidade dos mildios pulverulentos. Massee (33) foi capaz de induzir um fungo saprófito (*Trichothecium candidum*) a parasitar Begonia, através de passagens repetidas em folhas desta planta, que haviam sido injetadas com solução de açúcar a 2%.

Em geral, inoculações repetidas de um organismo em variedades muito suscetíveis diminuem a virulência do patógeno, ao passo que inoculações repetidas em variedades resistentes aumentam a patogenicidade.

Phytophthora infestans é citado frequentemente como um fungo que pode ser educado para atacar variedades de batata resistentes. Reddick e Mills (46) e Mills (35) foram capazes de aumentar a virulência de *P. infestans*, a tal ponto de conseguir que o fungo atacasse, severamente, várias variedades normalmente imunes. Mills (35), através de repetidas inoculações com um isolamento do fungo, obtido da batata, sobre o tomateiro, foi capaz de aumentar a virulência do patógeno, em relação a esse suscetível. Uma vez que a patogenicidade era elevada a um certo nível, permanecia estável, mesmo com 20 passagens em qualquer suscetível. Esses au-

tores empregaram culturas monozoospóricas, a fim de evitar a segregação de raças a partir de inóculo heterocariótico. Embora Bonde et al (4) neguem a capacidade de adaptação de *P. infestans*, Ferris (19), mais recentemente, também encontrou evidências de que o patógeno pode modificar a sua virulência por associação com suscetíveis resistentes.

Keitt e Langford (31), por outro lado, não foram capazes de aumentar a virulência de três linhas haplóides de *Venturia inaequalis*, pela sua passagem através dos tecidos de macieira.

Embora alguns autores como Christensen e Daly (13) neguem a ocorrência da modificação da patogenicidade dos fungos pela adaptação gradativa, afirmando que essas modificações, geralmente, são devidas a variações genéticas determinadas por mutações, heterocariose ou hibridação, o fato é que se têm avolumado as evidências da ocorrência da patogenicidade adaptativa. Entretanto, é de suma importância que se estabeleçam as relações específicas entre a resistência do hospedeiro e algumas substâncias químicas por ele produzidas, para que seja possível a obtenção de conclusões mais positivas. Segundo Buxton (9), uma ótima oportunidade para estudar o fenômeno por esse processo ocorre na murcha da ervilha, onde a qualidade do exudato das raízes de diferentes variedades parece ser importante em determinar resistência a *Fusarium oxysporum* f. *pisi*. O exudato de uma dada variedade inibe o crescimento de raças fisiológicas do fungo às quais a variedade resiste, mas não afeta as raças às quais é suscetível. Por exemplo, exudato das raízes da variedade Alaska, que é resistente à raça 1, inibe a germinação de esporos da raça 1; entretanto, estimula a germinação de esporos da raça 2, que é patogênica à dita variedade (78). Esse fenômeno possibilitou a Buxton realizar um interessante estudo com o objetivo de verificar se o exudato das raízes da variedade resistente Alaska era capaz de induzir alguma modificação nos esporos da raça 1. Aquêl autor trabalhou com culturas monospóricas, uninucleadas, geneticamente puras, portanto. Mantendo suspensões de esporos em exudatos, por vários períodos de tempo, e praticando inoculações sucessivas, em plantas cultivadas em vasos, verificou que, após 14 dias de permanência do exudato, a raça 1 tornou-se patogênica, comportando-se com a mesma virulência da raça 2. Provou, assim, que a patogenicidade da raça 1 era afetada por incubação em exudato das raízes. Entretanto, o próprio Buxton reconhece que não pode ser excluída a possibilidade da ocorrência de mutações,

que se multiplicariam, seletivamente, no exudato. Realizando isolamentos e inoculações, em sete ocasiões sucessivas, verificou que a raça adaptada manteve a sua patogenicidade. Portanto, a modificação parece ser duradoura, o que, à primeira vista, sugere variação genética mais do que adaptação enzimática. Vale ainda acrescentar que nenhuma das suspensões de esporos mantidas como testemunhas, em água estéril, modificaram sua patogenicidade; assim sendo, é pouco provável que as modificações ocorridas com *F. oxisporum* f. *pisi* resultassem de mutações ao acaso. As evidências levam a crer que o exudato agiu como determinante da modificação apresentada pelo fungo.

Assim, embora o mecanismo do fenômeno chamado de adaptação ainda não seja conhecido com segurança, as evidências experimentais acumuladas deixam poucas dúvidas sobre sua ocorrência.

3. Significação da Especialização Fisiológica

O conhecimento atual da Fitopatologia modificou não apenas o conceito sobre a natureza dos próprios patógenos, mas também as idéias sobre aquilo que pode ser esperado dos programas de melhoramento de plantas, no que diz respeito à obtenção de variedades resistentes a enfermidades. Dentre as numerosas implicações da grande variabilidade apresentada pelos organismos fitopatogênicos, notadamente os fungos, destaca-se a ameaça que certos patógenos constituem ao suprimento de alimento para a humanidade. Uma variedade resistente a uma dada enfermidade, comercialmente aceitável, não é mais encarada pelos pesquisadores como uma vitória final absoluta. Tal variedade é, geralmente, considerada como uma vantagem temporária, conferida à planta suscetível pelo geneticista, na luta secular entre suscetível x patógeno.

Segundo Walker (65), para que se obtenha sucesso em programa de melhoramento, visando obter resistência contra enfermidade, "é essencial que o tipo e extensão da variabilidade do organismo causal sejam conhecidos tanto quanto possível". A seguinte afirmativa de Johnson e Newton (29), em relação às ferrugens, talvez possa ser estendida a muitos

outros grupos de fitopatógenos: "a importância econômica da especialização fisiológica reside no fato que a existência de muitas raças fisiológicas em uma ferrugem confere-lhe uma versatilidade patogênica por meio da qual o fungo é capaz de atacar um largo espectro de variedades do suscetível, ainda que cada raça, individualmente, possua apenas um estreito espectro de suscetíveis".

Nem sempre é possível ao geneticista criar variedades agrônomicamente satisfatórias que sejam resistentes a um patógeno. Devido a isso, procura-se obter variedades resistentes às raças do patógeno reconhecidamente predominante na região ou regiões nas quais essas variedades serão cultivadas. Entretanto, pairará sempre a ameaça de que as raças reconhecidas como secundárias venham, eventualmente, adquirir grande importância. Um exemplo impressionante desse fenômeno foi a mudança verificada em raças de *Puccinia graminis* var. *tritici*, na América do Norte, entre 1930 a 1940 (39). Em 1930, a raça 56 constituía apenas 0,2% de população da ferrugem do colmo do trigo. Dez anos mais tarde, entretanto, aumentou para 30% a população. Essa marcante variação na abundância da raça 56 seguiu-se ao aumento do plantio da variedade de trigo Ceres, introduzida em 1926. Em 1920, Ceres era cultivada em 2,6% da área plantada com trigo; em 1934, atingia 31,5%. Segundo Stakman (39), a única explicação para o grande aumento da raça a partir de 1930, foi o incremento do cultivo da variedade Ceres. Em 1935, o ataque de ferrugem nessa variedade foi desastroso, ocasionando uma perda de 30% da população. Considerados como entidades biológicas e não como nomes, assevera Stakman, "trigo" e "ferrugem do colmo" não eram os mesmos, na área em questão, como havia sido há 30 anos passados.

A especialização fisiológica cria, portanto, problemas extremamente complexos para a agricultura moderna. Enquanto a natureza aumenta a virulência dos patógenos, cabe ao homem incorporar resistência às plantas cultivadas. Somente através de estudos básicos, visando determinar os limites da combinação de genes para a virulência nos patógenos e para produtividade e resistência às enfermidades nas plantas, será possível conhecer a complexidade e extensão do problema.

4. Literatura Citada

- 1 — Black, W. A genetical basis for the classification of strains of *Phytophthora infestans*. Proc. Royal Society of Edinburgh, B. 65: 36—51. 1952.
- 2 — ———, C. Mastenbroek, W. R. Mills, and L. C. Peterson. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives. Euphytica 2: 173—179. 1953.
- 3 — ———. Late blight resistance work in Scotland. American Potato Journal 31: 93—100. 1954.
- 4 — Bonde, R., F. J. Stevenson, and C. F. Clark. Resistance of certain potato varieties and seedling progenies to late blight in the tubers. Phytopathology 30: 733—748. 1940.
- 5 — Buxton, E. W. Heterokaryosis and variability in *Fusarium oxysporum* f. *gladioli* (Snyder and Hansen). J. General Microbiology 10: 71—84. 1954.
- 6 — ———. Heterokaryosis and parasexual recombination in pathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. J. General Microbiology 15: 133—139. 1956.
- 7 — ———. Differential rhizosphere effects of three pea cultivars on physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. *pisii*. Trans. British Mycological Society 40: 305—317. 1957.
- 8 — ———. Some effects of pea root exudates on physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. *pisii* (Linf). Trans. British Mycological Society 40: 145—154. 1957.
- 9 — ———. Mechanism of variation in *Fusarium oxysporum* in relation to host-parasite interactions. In Plant Pathology, Problems and Progress 1908—1958. Amer. Phytop. Soc. Madison, 1959. pp. 183.
- 10 — Christensen, J. J. The influence of the temperature on the frequency of mutation in *Helminthosporium sativum*. Phytopathology 19: 155—159. 1929.
- 11 — ———, and H. A. Rodenheiser. Physiologic specialization and genetics of the smut fungi. Botanical Review 6: 389—425. 1940.

- 12 — ————. Genetic variation in *Gibberella zeae* in relation to adaptation. *Phytopathology* 36: 396. 1946.
- 13 — ————, and J. M. Daly. Adaptation in fungi. *Annual Review of Microbiology* 5: 57—70. 1951.
- 14 — Cotter, R. V., and M. N. Levine. Experiments in crossing varieties of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 28: 6. 1938.
- 15 — Craigie, J. H. Discovery of the function of the pycnia of the rust fungi. *Nature* 100: 765. 1927.
- 16 — ————. Experiments on sex in rust fungi. *Nature* 120: 116—117. 1927.
- 17 — ————. The origin of physiologic races of rust fungi through hybridization. In *Genetics of pathogenic organisms*. Amer. Assoc. Adv. Sci. 1940. pp. 66—72.
- 18 — Eriksson, J. Über die Spezialisierung des Parasitismus bei den Getreiderostpilzen. *Ber. deut. bot. Ges.* 12: 292—331. 1894. Citado por Wolf & Wolf. *The Fungi*. Seg. Vol. 1947.
- 19 — Ferris, V. R. Histological study of pathogen susceptible relationship between *Phytophthora infestans* and derivatives of *Solanum demissum*. *Phytopathology* 45: 546—552. 1955.
- 20 — Gallegly, M. E. Physiologic races of *Phytophthora infestans*; their use in breeding for resistance. *Phytopathology* 45: 464. 1955.
- 21 — Giddings, N. J., and A. Berg. A comparison of the late blights of tomato and potato. A preliminary report. *Phytopathology* 9: 209—210. 1919.
- 22 — Graham, T. W. Nuclear phenomenon in *Helminthosporium gramineum*. *Phytopathology* 25: 284—286. 1935.
- 23 — Hansen, H. N., and R. E. Smith. The origin of new types of imperfect fungi from interspecific co-cultures. *Zentralblatt für Bart., Parasitenkunde and Infektionskunde* II. Abteilung Bd. 92. 1932.
- 24 — Hansen, H. N. The dual phenomenon in imperfect fungi. *Mycologia* 30: 442—455. 1938.
- 24^a — ————. Heterokariosis and variability. *Phytopathology* 32: 639—640. 1942.

- 25 — ———, and N. C. Snyder. Inheritance of sex in fungi. Proc. Natural Academy of Science 32: 227—273. 1946.
- 26 — Howatt, J. L. The late blight disease of potatoes and its causal fungus in Canada. American Potato Journal 34: 185—192. 1957.
- 27 — Hrushovetz, S. B. Cytological studies on *Helminthosporium sativum*. Canadian Journal of Botany 34: 321—327. 1956.
- 28 — Jinks, J. L. Heterokariosis — a system of adaptation in wild fungi. Proc. Royal Society of Botany 140: 83—99. 1952.
- 29 — Johnson, T., and M. Newton. Specialization, hybridization and mutation in the cereal rusts. Botanical Review 12:337—392. 1946.
- 30 — ———, M. Newton, and A. M. Brown. Hybridization of *P. graminis tritici* with *P. graminis secalis* and *P. graminis agrostidis*. Scientific Agriculture 13: 141—153. 1932.
- 31 — Keitt, G. W., and H. M. Langford. *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. 1. A ground work for genetic studies. American Journal of Botany 28: 805—820. 1941.
- 32 — Lehman, H. Untersuchung uber die Genetik und Physiologie der Resistenz der Kartoffel gegen *Phytophthora infestans* de Bary Die genetische Analyse der Resistenz von *Solanum demissum* sp. Review of Applied Mycology 20: 379. 1941.
- 33 — Masee, g. On the origin of parasitism in fungi. Trans. Royal Society of Botany 197: 7—24. 1904.
- 34 — Mastenbroek, L. Investigations into the inheritance of the immunity from *Phytophthora infestans* de B. of *Solanum demissum* Lindl. Euphytica 1: 187—198. 1952.
- 35 — Mills, W. R., and L. C. Peterson. The development of races of *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary on potato hybrids. Phytopathology 42: 26. 1952.
- 36 — Niederhauser, J. S., J. Cervantes, and L. Servin. Late blight in Mexico and its implications. Phytopathology 44: 406—408. 1954.

- 37 — Nelson, R. R. Transmission of factors for urediospore color in *Puccinia graminis* var. *tritici* by means of nuclear exchange between vegetative hyphae. *Phytopathology* 46: 538—540. 1956.
- 38 — Newton, M., and T. Johnson. Color mutation in *Puccinia graminis tritici* (Pers) Erikss. and Henn. *Phytopathology* 17: 711—725. 1927.
- 39 — ———, and T. Johnson. Specialization and hybridization of wheat stem rust, *Puccinia graminis tritici*, in Canada. Dom. Canada Dept. Agr. Bulletin 160: 1—60. 1927.
- 40 — ———, J. Johnson, and A. N. Brown. Hybridization of physiologic forms of *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 28: 6. 1938.
- 41 — Pontecorvo, G., J. A. Roper, and E. Forbes. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. *J. General Microbiology* 8: 198—210. 1953.
- 42 — ———, Mitotic recombination in the genetic system of filamentous fungi. *Caryologia* vol. Suppl. 1—9. 1954.
- 43 — ———, T. Gloor, and E. Forbes. Analysis of mitotic recombination in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Genetics* 52: 226—237. 1954.
- 44 — ———, and G. Sermon. Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. *J. General Microbiology* 11: 94—104. 1954.
- 45 — ———. The parasexual cycle in fungi. *Annual Review of Microbiology* 10: 393—400. 1956.
- 46 — Reddick, D., and W. Mills. Building up virulence in *Phytophthora infestans*. *American Potato Journal* 15: 29—34. 1938.
- 47 — Roane, C. W. Nuclear cytology and morphologic variation in *Helminthosporium carbonum* Ullstrup. *Phytopathology* 42: 480. 1952.
- 48 — Rodenheiser, H. A. Physiologic specialization in some cereal smuts. *Phytopathology* 18: 955—1003. 1928.
- 49 — Rowell, J. B., and J. E. DeVay. Genetics of *Ustilago zaeae* in relation to basic problems of its pathogenicity. *Phytopathology* 44: 356—362. 1954.

- 50 — Salaman, R. N. Recent progress in the breeding of potato varieties resistant to late blight (*Phytophthora infestans*). Review of Applied Mycology 11: 958. 1931.
- 51 — Salmon, E. S. Recent researches on the specialization of parasitism in the Erysiphaceae. New Phytologist 3: 55-60. 1904.
- 52 — Sanford, G. G., and W. P. Skoropad. Distribution of nuclei in hyphal cells of *Rhizoctonia solani*. Canadian J. Microbiology 1: 412-415. 1955.
- 53 — Schroeter, J. Entwicklung einiger Rostpilze. Beitr. Biol. Pflanzen 3: 69-70. 1879. Citado por Wolf & Wolf. The Fungi. Seg. Vol. 1947.
- 54 — Stakman, E. C. The problem of specialization and variation in phytopathogenic fungi. Genetica 18: 372-389. 1936.
- 55 — ———, J. J. Christensen, C. J. Eide, and B. Petursan. Mutation and hybridization in *Ustilago zeae*. Minnesota Agr. Exp. Sta. Tech. Bulletin 65. 1926.
- 56 — ———, M. N. Levine, and R. U. Cotter. Origin of physiologic forms of *P. graminis* through hybridization and mutation. Scientific Agriculture 10: 707-720. 1930.
- 57 — ———, M. N. Levine, and W. Q. Loegering. Identification of physiologic races of *Puccinia graminis tritici*. U.S.D.A. Bureau of Entomol. Plant Quarant. E-617. 1944.
- 58 — ———, F. V. Stevenson, and C. T. Wilson. Adaptation of monosporidial lines of *Ustilago zeae* to arsenic. Phytopathology 36: 411. 1946.
- 59 — ———. Plant diseases are shifty enemies. American Scientist 36: 321-350. 1947.
- 60 — ———. The nature and importance of physiologic specialization in phytopathogenic fung. Science 105: 627-632. 1947.
- 61 — ———, and J. G. Harrar. Principles of plant pathology. The Ronald Press Co., New York. 1957. pp. 133-143.
- 62 — Stanier, R. Y. Enzymatic adaptation in bacteria. Annual Review of Microbiology 5: 35-56. 1951.

- 63 — Tyler, L. J., and C. P. Shumway. Hybridization between *Sphacelotheca cruenta* and *Sorosporium reilianum*. *Phytopathology* 25: 375-376. 1935.
- 64 — Vakili, N. G., and R. M. Caldwell. Recombination of spore color and pathogenicity between uredial clones of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 47: 536. 1957.
- 65 — Walker, J. C. Disease resistance in the vegetable crops. *Botanical Review* 7: 458-506. 1941.
- 66 — Ward, H.M. Further observation on the brown rust of the Bromes, *Puccinia dispersa* (Erikss) and its adaptative parasitism. *Ann. Mycol.* 1: 132-151. 1903.
- 67 — Waterhouse, W.L. A preliminary account of the origin of two new Australian forms of *Puccinia graminis tritici*. *Proc. Linn. Soc. New South Wales* 54: 96-106. 1929.
- 68 — Watson, W. A. Further studies on the production of new races from mixtures of races of *Puccinia graminis* var. *tritici* on wheat seedlings. *Phytopathology* 47: 510-412. 1957.
- 69 — Wilcoxson, R. D., J. F. Tuite, and S. Tucker. Anastomosis of germ. tubes in *Puccinia graminis*. *Phytopathology* 47: 537. 1957.
- 70 — Wilson, C. T. The development of increased tolerance to sodium arsenite by *Sclerotium rolfsii* and *S. delphinii*. *Phytopathology* 47: 537. 1957.
- 71 — Wolf, F. A., and F. T. Wolf. *The Fungi*. Vol. II. John Wiley & Sons Inc., London, 1947. p. 257.

