

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *Bipolaris sorokiniana*,
ISOLADOS DE SEMENTES DE TRIGO UTILIZANDO URP-PCR.**

Michele Bertoni Mann
Bióloga /ULBRA

Fevereiro, 2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE**

**ESTUDO DA DIVERSIDADE GENOTÍPICA DE *Bipolaris sorokiniana*,
ISOLADOS DE SEMENTES DE TRIGO UTILIZANDO URP-PCR.**

Michele Bertoni Mann
Bióloga/ULBRA

Dissertação apresentada como requisito para obtenção de grau de Mestre em
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Orientador: Sueli T. Van Der Sand
Co- orientador: Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

Fevereiro, 2010

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

M281e Mann, Michele Bertoni

Estudo da diversidade genotípica de *Bipolaris sorokiniana*, isolados de sementes de trigo utilizando URP-PCR / Michele Bertoni Mann. – 2010.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

Orientação: Prof. Sueli Teresinha van der Sand
Co-orientação: Prof. Ana Paula Guedes Frazzon

1. *Bipolaris sorokiniana* 2. Fungos 3. Reação em cadeia da polimerase 4. Trigo I. Sand, Sueli Teresinha van der, orient. II. Frazzon, Ana Paula Guedes, co-orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

À professora Sueli Van Der Sand pela orientação, amizade e compreensão.

À professora Ana Paula Guedes Frazzon pela co-orientação, por ensinar o caminho das pedras.

À Cristina por me ajudar por quase dois anos e o pior sem cobrar nada por isso e também a Thaísa por contribuir muito quase no fim dessa caminhada.

Aos queridos colegas Franciele, Naiara, Fernanda, Adriane, Tiane, Valdionir, Igor, Elio, Patricia e Renata Fagundes.

A Ana Paula Cassenego por toda a parceria e torcida por nós.

Ao pessoal do Lab.164 em especial a Sabrina Salamoni que me ensinou muito, devido a ela que estou aqui e pelos conselhos que me dá até hoje.

À Sayonara Peixoto por me receber com carinho no laboratório em um primeiro momento e a Leila por estar sempre pronta a ajudar.

Ao pessoal da virologia, pelas consultas ao Fabrício, auxílio da Martha e dicas do Eber.

Ao Rafael Lopes por ser meu orientador de vida, de profissão, e de que caminho seguir.

A minha mãe por ser um exemplo de luta e de vida, aprendi com ela que mesmo quando achamos que vai dar tudo errado, acreditando dá certo e a toda minha família.

Ao apoio do CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

Estudo da diversidade genotípica de *Bipolaris sorokiniana*, isolados de sementes de trigo utilizando URP-PCR.

Autor: Michele Bertoni Mann

Orientador: Prof. Dr. Sueli T. Van Der Sand

Co-orientador: Prof.Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

¹RESUMO

Mancha marrom ou Helminthosporiose é uma das principais doenças do trigo, causada pelo fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*, sendo responsável por grandes perdas econômicas no cultivo do trigo no mundo inteiro. Este fungo apresenta uma grande diversidade morfológica, fisiológica e genética. Com objetivo de caracterizar a diversidade molecular de amostras monospóricas de *B. sorokiniana* isolados de sementes do Brasil e outros países, foram utilizados 60 isolados monospóricos tendo o DNA genômico desses isolados sido submetidos à amplificação por PCR. Foram utilizados 12 oligonucleotídeos iniciadores universais construídos a partir de sequências repetidas do genoma do arroz (URP). Os perfis gerados foram analisados pelo método de médias aritméticas não ponderadas (UPGMA). O método PCR – URP permitiu obter informações importantes sobre o perfil genético das culturas monospóricas mostrando distinções entre os três conídios isolados oriundos da mesma cepa polispórica. Os oligonucleotídeos URP-30F, URP-6R, URP-17R e URP-38F amplificaram com um elevado índice de isolados. Em contra partida, os oligonucleotídeos URP-13R, URP- 25F e URP-32F apresentaram um perfil de amplificação menor entre os isolados do fitopatógeno. O número total de fragmentos gerados com cada um dos oligonucleotídeos variou entre 41 e 77 fragmentos. Os oligonucleotídeos URP-17R, URP-30F, URP-32F e URP-6R apresentaram maior índice de fragmentos polimórficos. Os isolados apresentaram uma grande diversidade intra-específica entre os oligonucleotídeos iniciadores URP e entre os conídios monospóricos. A análise forneceu informações relevantes sobre a variabilidade genética e a relação entre os isolados de *B. sorokiniana*.

¹ Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil (99 p.) Fevereiro, 2010

Study of genetic diversity of *Bipolaris sorokiniana* isolated from wheat seed using URP-PCR

Author: Michele Bertoni Mann

Advisor: Dr. Sueli T. Van Der Sand

Coadviser: Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

² ABSTRACT

Leaf spot disease or helminthosporiosis is one of the most important diseases of wheat cultures caused by the phytopathogen *Bipolaris sorokiniana*. It is responsible for great economic loss of wheat cultivation worldwide. This fungus presents a great morphologic, physiologic and genetic diversity. The aim of this study was to characterize the molecular diversity of *B. sorokiniana* monosporic isolates isolated from seeds from Brazil and other countries. For this purpose 60 monosporic isolates were used. The genomic DNA of this isolates were submitted to PCR amplification using 12 universal primers built from repeated sequences of rice genome (URP). The analysis of the amplification profile were calculated by Unweighted Pair Group Arithmetic Mean (UPMGA) Method. The PCR-URP method provided important information about the genetic profile to the monosporic culture, showing distinctions between the three spore isolates of the same polysporic strain. The primers URP-30F, URP-6R, URP-17R and URP-38F were able to amplify a higher percentage of the isolates been the more efficient in the study of this phytopathogen. However, the primers URP-13R and URP-32F have shown a lower amplification profile between the *B. sorokiniana* isolates. The number of fragments that resulted from the amplification of each primer had varied between 41 and 77 fragments. The primers URP-17R, URP-30F, URP-32F and URP-6R generated a higher number of polymorphic fragments with the isolates. The analysis provided relevant information about the variability and genetic relationship between *B. sorokiniana* isolates.

² Master Of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (99p.) February, 2010.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS	VIII
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	X
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Origem e Evolução do trigo.....	4
2.2 Aspectos Econômicos	5
2.3 Doenças do trigo	6
2.4 Fitopatógeno <i>Bipolaris sorokiniana</i>	8
2.5 Impactos da doença.....	11
2.6 Controles das manchas foliares	13
2.7 Medidas de Controle	14
2.8 Fatores climáticos e cultivar	14
2.9 Variabilidade em populações de fungos	15
2.10 Técnicas moleculares	17
3. MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1. Culturas Fúngicas	20
3.2 Obtenção de culturas monoconidiais	20
3.3 Micélio para extração do DNA genômico	22
3.4 Extração do DNA genômico	22
3.5 Quantificação DNA.....	23
3.6 Amplificação do DNA genômico utilizando PCR-URP	23
3.7 Curva padrão de uso de Cloreto de Magnésio.....	25
3.8 Condições de amplificação	25
3.9 Eletroforese em gel de agarose	25
3.10 Cálculo de peso molecular	26
3.11 Análise estatística	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1 Obtenção das culturas monoconidiais	27

4.2	Padronização da reação de PCR.....	28
4.2.1	Concentração de Cloreto de magnésio.....	28
4.2.2	Concentração de BSA.....	28
4.3	Amplificações do DNA genômico dos isolados de <i>B. sorokiniana</i>	28
4.4	Análise do dendrograma formado a partir dos dados do URP/ PCR dos isolados de Coleções Internacionais com todos os oligonucleotídeos.....	39
4.5	Análise do dendrograma formado a partir dos dados de URP/ PCR com todos os isolados do Brasil e todos os oligonucleotídeos	42
4.6	Análise do dendrograma dos dados obtidos do PCR / URP isolados do Brasil e de Coleções Internacionais com todos os oligonucleotídeos	45
5.	CONCLUSÕES.....	52
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54
8.	APÊNDICE.....	59
8.1	Meios de cultura e soluções utilizadas.....	60
8.1.1	Meio de cultura BDA	60
8.1.2	Meio de cultura batata dextrose	60
8.1.3	Tampão de extração de DNA.....	60
8.1.4	Clorofórmio-álcool isoamílico	61
8.1.5	Fenol: clorofórmio	61
8.1.6	Tampão de fenol (pH 8,0) para 250ml de fenol.....	61
8.1.7	Tampão TAE 50X.....	61
8.1.8	Tampão TAE 1X.....	62
8.1.9	Oligonucleotídeos iniciadores	62
8.1.10	dNTPS(desoxiribonucleotídeos trifosfatados)	62
8.1.11	Tampão de amostra	62
8.1.12	Proteinase K (fungal).....	62
8.1.13	Acetato de sódio	63
8.2	DENDROGRAMAS	64
9.	VITA.....	88
9.1	Dados Pessoais	88
9.2	Formação acadêmica.....	88
9.3	Experiência Profissional.....	88

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Origem dos Isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	21
TABELA 2. Seqüência de Oligonucleotídeos URP.....	24
TABELA 3. Isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i> que não apresentaram produto de amplificação e percentual de amplificação com cada oligonucleotídeo iniciador URP.....	31
TABELA 4. Avaliação do número e tamanho dos fragmentos gerados por <i>B.sorokiniana</i> com 12 oligonucleotídeos iniciadores.....	33
TABELA 5: Análise dos perfis com todos os oligonucleotídeos URP.....	47

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de <i>B. sorokiniana</i> com oligonucleotídeo URP-1F.....	35
FIGURA 2. Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de <i>B. sorokiniana</i> com oligonucleotídeo URP-1F.....	36
FIGURA 3. Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de <i>B. sorokiniana</i> com oligonucleotídeo URP-2F.....	37
FIGURA 4. Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de <i>B. sorokiniana</i> com oligonucleotídeo URP-30F.....	38
FIGURA 5. Dendrograma de Isolados de Coleções Internacionais com todos os oligonucleotídeos iniciadores gerados pela Distância Euclidiana, segundo o método “UPGMA”.....	41
FIGURA 6: Dendrograma dos isolados do Brasil com todos os oligonucleotídeos iniciadores, gerado pela Distância Euclidiana, segundo o método “UPGMA”.....	44
FIGURA 7: Dendrograma dos isolados do Brasil e de outros países com todos os oligonucleotídeos iniciadores, gerado pela Distância Euclidiana, segundo o método “UPGMA”.....	50 51

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA: Ácido desoxirribonucléico

mL: Mililitro

μL: Microlitro

ng: Nanograma

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

UPMGA: Unweight Pair Group Using Average

BSA: Albumina Sérica Bovina

TSA: Tampão de corrida

Tm: Temperatura de anelamento

1. INTRODUÇÃO

O trigo representa um dos cereais mais importantes na alimentação humana, utilizado em larga escala como matéria-prima na elaboração de vários produtos alimentícios, bebidas e uma menor parcela da produção destina-se à indústria de ração animal.

No cenário produtivo, o Brasil destaca-se como um grande produtor de grãos, porém, não é auto-suficiente em trigo onde depende de importações para suprir o seu consumo interno. Além deste, temos outros agravantes que influenciam negativamente na produção, como a instabilidade climática e a incidência de doenças fúngicas que podem gerar perdas significativas de até 50% nas culturas de inverno.

No Brasil e em outros países de clima quente e úmido há a incidência da Helmitosporiose, cujo agente causal é o fungo *Bipolaris sorokiniana* (Sacc.in Sorok) Shoemaker, 1959, (teleomorfo): *Cochiobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsl. Ex dastur. Esse fungo encontra-se associado principalmente à semente e representa uma das principais doenças prevalentes nas regiões tritícolas. Apesar da doença estar amplamente disseminada nas regiões produtoras de trigo, o plantio constante de sementes contaminadas pode aumentar a fonte de inóculo no campo, proporcionando

condições favoráveis ao patógeno e causando grandes prejuízos aos produtores. A utilização de sementes livres do patógeno é uma medida que visa diminuir a fonte de inóculo, conseqüentemente dificultando a propagação da moléstia.

Devido aos problemas gerados por este fungo e as evidentes diferenças observadas em seu genoma, faz-se necessário a caracterização molecular para uma melhor compreensão de sua variabilidade. A condição multinucleada das células do micélio e conídios de *B.sorokiniana*, com subsequente heteriocariose, poderia levar a combinação mitótica e a novos arranjos por haploidização, podem estar contribuindo para o polimorfismo detectado no DNA deste fitopatógeno.

Diversas técnicas moleculares como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), PCR –RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD da região ITS1-ITS2 têm sido empregadas para a identificação de microrganismos no que diz respeito à diversidade genética de fitopatógenos. Com esse propósito o URP-PCR (Universal Rice Primer) pode contribuir para o conhecimento da variabilidade do patógeno, visto que a técnica é capaz de detectar a diversidade genética inter e intra-específica entre vários microrganismos de uma população de forma rápida e eficaz.

Portanto, a utilização da técnica URP-PCR na caracterização do fungo *Bipolaris sorokiniana* poderá fornecer informações relevantes sobre a variabilidade genética do fitopatógeno. Através da caracterização de seus perfis genéticos, busca-se estabelecer marcadores moleculares que poderão ser usados na identificação do fitopatógeno e desta forma contribuir

significativamente para o aumento da produtividade das plantações de trigo, bem como para a redução do período de quarentena no qual, o grão necessita ficar estocado. A condição multinucleada das células do micélio e conídios de *B.sorokiniana*, com subsequente heteriocariose, o que poderia levar a combinação mitótica e a novos arranjos por haploidização, estariam contribuindo para o polimorfismo detectado no DNA deste fitopatógeno.

Desta forma, o presente estudo teve por objetivos estudar a diversidade genética de *B. sorokiniana* isolados de sementes de trigo do Brasil e de outros países, determinar a variabilidade molecular de isolados monospóricos através da técnica URP-PCR, correlacionar os padrões de fragmentos obtidos, e relacionar os padrões de polimorfismo com a região geográfica de origem dos isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e Evolução do trigo

Estima-se que o homem cultive o Trigo (*Triticum vulgare*) há seis mil anos, no início utilizava-se pedras rústicas para a obtenção da farinha. Grãos de trigo foram encontrados no Egito, nos jazigos de múmias, nas ruínas da Suíça e nas pirâmides de Dashur, construções estas que datam de mais de três mil anos a.C. Os egípcios religiosos atribuíram o surgimento do grão à Deusa Isis, os fenícios à Dagon, os Indus à Brama, os árabes à São Miguel e os cristãos à Deus. A utilização do pão branco foi atribuída aos egípcios que com o passar dos tempos aprimoraram as técnicas de fabricação a fim de aperfeiçoar a fermentação (EMBRAPA TRIGO, 2005).

O primeiro registro de plantio de trigo no Brasil é de 1534, quando foi realizado o cultivo na capitania de São Vicente. Somente em 1737, a lavoura tritícola foi introduzida no Rio Grande do Sul por colonos vindos dos Açores. A cultura adquiriu tamanha expressão que nas duas décadas iniciais do século XIX, o Rio Grande do Sul chegou a exportar o cereal para outros estados e até para outros mercados. Mas entre 1810-1815 com o aparecimento de fitopatógenos, o trigo deixou de existir como cultivo econômico (Soares, 1980).

O trigo voltou a ser cultivado no começo do século XIX quando o governo tomou medidas para incentivar a lavoura e a pesquisa, selecionando sementes mais apropriadas às condições de solo e clima.

Segundo Costa (1990), no início do século XIX, o Brasil exportava 13,5 mil toneladas de trigo. Após a incidência das doenças, a produção caiu para 2,7 mil toneladas. Porém foi apenas em 1927, quando a produção alcançou 120 mil toneladas, que o Ministério da Agricultura criou três estações experimentais para a pesquisa da cultura do trigo. Em 1947, a produção de trigo no Brasil atingiu 340 mil toneladas de grãos.

2.2 Aspectos Econômicos

O trigo possui um importante papel no aspecto econômico e nutricional da alimentação humana, pois a farinha é largamente utilizada na indústria alimentícia (Ferreira, 2003; Gieko et al., 2004). A qualidade do grão de trigo é resultado da interação das condições de cultivo (interferência do solo, clima, pragas, manejo de cultura e da cultivar) acrescido das operações de colheita, como a secagem e armazenamento, fatores estes que influenciam diretamente sobre produto final, que é a farinha de trigo (El Dashi & Miranda, 2002; Gutkoski & Neto, 2002).

Globalmente o trigo é a segunda maior cultura de cereais, seguido pelo milho e arroz. Este grão é utilizado como matéria-prima na elaboração de vários produtos alimentícios, bebida e na produção de ração animal.

Segundo relatório divulgado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2009) a estimativa da produção brasileira de trigo para safra de 2009/2010 é de 4,5 milhões de toneladas, os estoques mundiais de trigo em 190,91 milhões de toneladas e o consumo doméstico de trigo está estimado em 11,4 milhões de toneladas. Com este cenário, o Brasil necessita importar trigo para suprir a demanda interna. Tanto o trigo quanto a farinha são os únicos alimentos rotineiramente importados pelo Brasil, sendo a Argentina o maior provedor do mercado brasileiro.

O cultivo do trigo no Brasil é realizado principalmente na região sul, aproximadamente 90% da produção brasileira, sendo que o estado do Paraná possui a maior área plantada, seguido pelo Rio Grande do Sul (Zylberstajn et al., 2004).

Além da produção insuficiente para suprir consumo interno, a produção brasileira de trigo encontra obstáculos como a incidência de doenças, muitas delas fúngicas, que atacam a planta desde a raiz até o caule, as folhas e as sementes.

2.3 Doenças do trigo

Os patógenos que ocorrem com maior frequência na cultura de trigo são oídio, causado por *Oidium monilioides* (Ness), as ferrugens da folha e do colmo, *Puccinia triticina* Rob.ex. Desm e *Puccinia graminis* Pers f. sp. *tritici* Heriks & Henn. respectivamente, a mancha da gluma causada por *Stagonospora nodorum*, (Berk.), a mancha marrom causada por *Bipolaris*

sorokiniana (Sacc.In.Sorok), (teleomorfico *Cochiobolus sativus* (Ito & Kurib) Dreschs. Ex Dastur.), a mancha amarela causada por *Drechslera tritici-repentis* (Died) Drechs. e a giberela, causada por *Fusarium graminearum* Schwabe (Picinini & Fernandes, 2003). Estes microrganismos são responsáveis, em grande parte, pela perda ou baixos rendimentos na produção do grão.

As manchas foliares em trigo são causadas predominantemente por *S.nodorum*, *D. tritici-repentis* e *B. sorokiniana*. Conforme estudo realizado por Pretes et al (2002), estes patógenos apresentaram maior incidência sob o sistema de plantio direto e na monocultura, o que pode ser explicado pela emergência das plântulas junto aos restos culturais (Reis et al., 2001).

Devido à necessidade de conservação do solo o país adotou um sistema de plantio direto e por este fato surgiram mudanças freqüentes no tipo de doença do trigo. As manchas foliares foram favorecidas por essa condição uma vez que os patógenos causadores dessas doenças sobrevivem em restos culturais.

Nos últimos anos, a mancha amarela, determinada pelo fungo *Drechslera tritici-repentis*, tem sido prevalente no Rio Grande do Sul em relação à septoriose, causada pelo fungo *Phaeosphaera nodorum*, e à mancha marrom, provocada por *Bipolaris sorokiniana*, principalmente, pelo fato de que *D. tritici-repentis* multiplica-se facilmente na palha do trigo, proporcionando inóculo em abundância. Poucas cultivares de trigo, hoje no mercado, apresentam resistência a essas doenças. (Embrapa Trigo, 2005)

Em função da elevada quantidade de inóculo na palha, os primeiros sintomas da mancha amarela ocorrem muito cedo, determinando a necessidade de aplicação de fungicidas já na fase inicial da cultura. Quando essa aplicação não é efetuada, a doença progride rapidamente, causando necrose do tecido vegetal e dificultando o controle da doença na fase mais crítica de controle da mesma. (EMBRAPA Trigo, 2005).

Ainda, os fungos causadores de helmintosporiose, podem ter influência negativa direta na germinação e no estabelecimento de pastagens. Já em sementes armazenadas, têm a capacidade de sobreviver como micélio no endosperma da semente, sob condições de estresse hídrico, e colonizar o sistema radicular e parte aérea, durante a germinação (Neergard, 1979).

No que se refere à resistência dos hospedeiros em geral, na cultura do trigo as cultivares apresentam maior produtividade imediatamente, após o seu lançamento, pois ainda possuem resistência às doenças fúngicas. Porém, com o passar dos anos novas raças e variantes dos fungos surgem quebrando a resistência e reduzindo a produtividade (Cunha e Trombini, 1999).

2.4 Fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*

O fungo causador da mancha marrom ou helmintosporiose é denominado *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In Sorok) Shoemaker, 1959. (sinônimos *H.sativum* Pammel, King & Bakke, Sacc.ex.Sorok, *D.sorokiniana* (Sacc.) Subram & Jain) que corresponde a fase anamórfica do fungo é um fungo fitopatogênico de centeio, cevada, aveia, trigo e outras gramíneas.

Apresenta conidióforos solitários ou em grupos, retos ou flexuosos, algumas vezes geniculados, cor palha marrom-escuros, septados e medem 100 - 400 μm x 6,8 μm (Ellis, 1971). Conídios jovens são sub-hialinos, mas tornam-se amarelo esverdeado a marrom-oliváceos escuros, curvados, e quando em meio de cultura apresentam-se retos, fusiformes ou ligeiramente elipsóides. Medem de 80 - 170 μm x 12 - 24 μm e possuem de 4 a 10 septos (Zillinasky, 1983). Wiese (1987) descreve medidas de 6-8 x 110-150 μm para os conidióforos e 15-20 x 60-120 μm para os conídios de *B. sorokiniana*, com 3 a 10 pseudoseptos. Os conídios germinam por um ou ambos os pólos, o primeiro septo é produzido delimitando 1/3 basal do conídio e o hilo é externo, porém truncado (Muchovej et al, 1988).

Na fase teleomórfica o fungo é denominado *Cochliobolus sativos* (Ito & Kuribayashi) Dresxhsler ex Dastur, um ascomiceto de rara ocorrência na natureza. Pseudotécios são pretos, globosos, com 300-400 μm de comprimento. Os ascos são clavados e medem de 20-45 x 120-250 μm e contém de 4 a 8 ascosporos encurvados em helicóide (Ellis, 1971, Mehta, 1978, Wiese, 1987).

O gênero *Bipolaris* contém aproximadamente 45 espécies a maioria das quais são parasitas de plantas, como: *B. maydis* (milho) *B. oryzae* (arroz), *B. sacchari* (cana-de-açúcar). Entretanto, várias espécies, como *B. australiensis*, *B. hawaiiensis* e *B. spicifera*, são patogênicas para o homem.

Pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, família Dematiaceae

(Alexopoulos & Mims, 1985). Os fungos pertencentes a essa categoria taxonômica são chamados de fungos imperfeitos (ou mitospóricos), pois possuem apenas a reprodução assexuada (conidial) como forma de propagação da espécie.

Os sintomas iniciais da doença são a ocorrência de lesões necróticas pardas nas primeiras folhas, em virtude da transmissão a partir das sementes. Nas demais folhas as lesões possuem formato elíptico, 0,5 a 1,0 cm de comprimento, e coloração variável, inicialmente cinza claro até negras (Reis et al., 2001). Quando a temperatura encontra-se entre 23 a 30^o C, o número das lesões causadas por *B.sorokiniana* é maior, fato que justifica a presença da doença ser mais freqüente em regiões de clima tropical e subtropical. Os danos na produtividade podem ultrapassar a 30% e a partir dos 53 dias após a emergência podem ser superiores. (Oliveira & Gomes, 1984).

Como algumas espécies de gramíneas silvestres suportam baixos níveis do fungo, é difícil eliminá-lo completamente das áreas agrícolas afetadas. O fungo *B. sorokiniana* tem sido isolado de lesões radiculares de algumas gramíneas forrageiras, invasoras e nativas, tais como: azevém (*Lolium multiflorum*), fetusca (*Fetusca arundinacea*), capim-lanudo (*Holcus lanatus*), pensacola (*Paspalum saraurae*), capim-arroz (*Echinochloa cruzgalli*), capim-colchão (*Digitaria sanguinalis*) e de itapuã (*Brachiaria plantaginea*) (Müller, 2000).

O fungo pode infectar todos os órgãos das plantas suscetíveis, sendo que a fonte de inóculo primário são as sementes, os restos culturais

infectados, as plantas voluntárias, os hospedeiros secundários e os conídios livres dormentes no solo (Reis et al., 2001).

No processo de infecção, o fungo passa por uma fase biotrófica de crescimento sobre o hospedeiro e uma necrotrófica. A primeira fase é caracterizada pela penetração da cutícula e da parede celular, seguida do desenvolvimento das hifas dentro das células da epiderme. Ocorre a invasão do mesófilo na fase necrotrófica e a morte das células atacadas (Kumar et al., 2002).

O fitopatógeno produz toxinas sesquiterpenóides sintetizadas a partir do farnesol. O prehelmentosporol é o mais abundante e ativo composto, exercendo seu efeito inibitório sobre ATPase (Kumar et al., 2002). Essa mesma toxina tem propriedade anfipática que pode funcionar como um detergente, auxiliando no amolecimento da camada cerosa da cutícula (Nilson et al., 1993). Outra toxina também importante é o helmintosporol que afeta a permeabilidade da membrana, fosforilação oxidativa, fotofosforilação e o bombeamento de prótons através da membrana plasmática. Nakajima et al. (1994) isolaram de filtrados de cultura fúngica, um composto chamado “sorokianina” que apresenta efeito inibitório sobre a germinação de sementes de aveia.

2.5 Impactos da doença

No Brasil este patógeno é de grande importância para a cultura do trigo, encontrando-se disseminado por todas as regiões tritícolas, ocasionando moléstias que recebem várias denominações conforme o órgão afetado da

planta: podridão comum da raiz, mancha marrom, carvão do nó e ponta preta dos grãos.

A mancha marrom é considerada no compêndio de proteção de culturas como uma doença de grande impacto econômico, com elevada incidência. Por esse motivo, *B. sorokiniana* é o mais importante patógeno agregado a semente e, normalmente, o principal alvo do tratamento com fungicidas. O inóculo presente na semente é responsável pelo estabelecimento de levantamentos sanitários de sementes comercializadas no Brasil. Neste levantamento a presença de *B. sorokiniana* tem sido constante cujos percentuais variam conforme o ano, o local e a cultivar, podendo chegar perto de 100% (Forcelini,1995). O tratamento com fungicidas das sementes infectadas somente é recomendado para lotes com incidência inferior a 30%, pois acima deste valor a eficiência do produto fica comprometida (Indicações Técnicas da Comissão Sul brasileira de Pesquisa de Trigo Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo,(2001). Para tanto, faz-se necessário o diagnóstico adequado da presença de *B. sorokiniana* em sementes.

O fungo *B. sorokiniana* apresenta uma elevada variabilidade, tanto morfológica quanto fisiológica. A variabilidade morfológica e o tempo necessário para o cultivo deste patógeno dificultam a sua identificação, impossibilitando que medidas de controle adequadas sejam adotadas para reduzir a moléstia, enquanto que a fisiológica dificulta o estabelecimento de variedades de trigo resistentes a estas moléstias.

Em fevereiro de 1999, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento instituiu, em nível nacional, o Programa de Sanidade de Pragas

Não Quarentenárias Regulamentáveis na Produção e Comercialização de Sementes através da Portaria nº71, de 22/02/1999. Esta portaria visa à adoção de controle de qualidade em nível de campo de produção de sementes e análise laboratorial de sanidade de pragas não quarentenárias regulamentáveis.

2.6 Controles das manchas foliares

O controle químico, em órgãos aéreos, das manchas foliares, a utilização de sementes sadias, o tratamento com produtos e doses adequadas e a rotação de culturas são medidas que, associadas, visam reduzir o inóculo primário, retardando o aparecimento de fungos causadores das manchas foliares na lavoura, mesmo em cultivares suscetíveis e em anos de condições adversas (Indicações Técnicas, 2005).

Os fungos *B.sorokiniana* e *D.tritici-repentis* são parasitas necrotróficos, ou seja, possuem a habilidade de extrair nutrientes de tecidos mortos do hospedeiro. Assim, a presença dos restos culturais dos cereais de inverno numa lavoura possibilita a sobrevivência dos patógenos necrotróficos (Reis et al,2001a). Por esse fato, são necessárias medidas de controle como a erradicação ou a redução da densidade do inóculo a nível inferior ao limiar numérico de infecção (Reis & Casa, 1996).

2.7 Medidas de Controle

O cultivo de uma mesma espécie vegetal e em larga escala contribui para ocorrência de epidemias, tornando-se necessário o uso de medidas rápidas, práticas e eficientes no controle da doença em cereais de inverno como trigo, cevada e aveia. Assim os fungicidas têm papel na sustentabilidade econômica (Reis,1996).

A aplicação de fungicidas é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, pela facilidade de uso como também pelos resultados imediatos obtidos. Porém, o seu uso constante pode promover a seleção de fungos resistente colocando em risco a eficiência do método (Ghini & Kimati, 2000). Segundo Kimati (1987), o desenvolvimento de populações de fungos resistentes a fungicidas pode apresentar conseqüências desastrosas para o produtor, que pode ter sua safra comprometida.

2.8 Fatores climáticos e cultivar

A eficiência do controle é dependente do grau de suscetibilidade da cultivar utilizada e das condições climáticas que prevalecem na época para obtenção de um resultado eficaz. Estes fungicidas atuam especificamente na germinação dos esporos devendo, portanto, ser aplicados preventivamente. Contudo, em virtude das condições climáticas, o tratamento preventivo de manchas foliares nem sempre é possível, determinando um controle deficiente da doença. De fato, o excesso de chuvas a partir do início da primavera amplia

as dificuldades relacionadas ao controle de doenças na cultura do trigo, e por este aplicação de fungicidas é prejudicada. (EMBRAPA, 2005)

2.9 Variabilidade em populações de fungos

O estudo de Asad et al. (2007) avaliou a patogenicidade de 87 isolados de *B. sorokiniana* deste total, dois isolados foram pouco agressivos, 57 ligeiramente agressivos e 27 moderadamente agressivo enquanto que um isolado exibiu reação muito agressiva.

Poloni et al. (2008) realizou análises da variabilidade morfológica de culturas policonidiais e monoconidiais de *B. sorokiniana* e observou que havia variações morfológicas em diferentes meios de cultivo e até mesmo nas repetições em culturas policonidiais. Já as culturas monoconidiais, não apresentaram diferença significativa na taxa de crescimento e entre os diferentes meio de cultivo.

Hansen & Smith (1932), Titilini (1962) e Isaac (1992), conceituaram o processo como a condição na qual dois ou mais núcleos, geneticamente distintos, coexistem em um citoplasma comum, condição indispensável para que ocorra o ciclo parassexual. Os heterocários formam-se por mutações ou migração nuclear resultante de anastomose entre hifas com diferentes genótipos. Ainda alguns fungos podem viver na forma heterocáriotica por determinado período de tempo. Dessa forma, as características genéticas de dois genomas uninucleados distintos podem ser incorporados em um único genoma binucleado.

Conforme estudos realizados por Nelson et al.(1955) demonstraram ao trabalhar com *Puccinia graminis* f.sp.*tritici* que a heterocariose pode levar ao aparecimento de novas raças. O heterocarion resultante da união das raças 38 e 56 deste fungo é patogênico a Khapli Emmer, cultivar de trigo resistente às raças 38 e 56. Fungos heterocarióticos possuem a vantagem de se adaptar somaticamente às condições ambientais, eliminando os custos associados com a reprodução na geração de formas variantes.

Pontecorvo & Roper (1952) observaram pela primeira vez o ciclo parassexual em fungos filamentosos. Day,1974, define ciclo parassexual como fusão de dois núcleos do heterocarión, resultando na produção de um diplóide heterozigoto. Podendo ocorrer recombinação mitótica e arranjo ao acaso por haploidização. Fungos que não possuem reprodução sexual, o ciclo parassexual tem importância por ser o mecanismo de recombinação que contribui para a geração e armazenamento de variação gênica.

Burdon & Silk, (1997), afirmaram que é comum os processos de mutação e recombinação entre plantas e fungos fitopatogênicos e são uma fonte de variação genética. Estudos com uma grande variedade de fungos revelam a importância de alguns desses mecanismos e a influência no agrupamento em relação a diversidade. Burdon & Silk (1997), salientam ainda que alguns sistemas possam contribuir para a variabilidade genética, como migração e fluxo gênico, mutação (através deleção, inserção ou transposição) e finalmente por recombinação em microrganismos com reprodução assexuada onde pode ocorrer mudanças nucleares, parassexualidade, mudanças no

citoplasma, e ainda, recombinação simples ou *de novo*, nos que possuem reprodução sexuada.

Tinline & MacNeill (1969) e Azevedo (1976) salientaram que os mecanismos que conferem variabilidade em fungos fitopatogênicos são a mutação, a parassexualidade, heterocariose e recombinação somática em fungos imperfeitos, e recombinação sexual em fungos de outras classes. Tinline (1961) obteve clones prototróficos e auxotróficos de *Cochliobolus sativus*, irradiando hifas homocarióticas com ultravioleta, demonstrando que a heterocariose pode ser obtida através da mutação.

2.10 Técnicas moleculares

Os métodos utilizados na identificação de fungos baseiam-se nas características morfofisiológicas, portanto, é necessário aliar as técnicas moleculares para uma correta e segura caracterização dos microrganismos.

Diversas técnicas moleculares foram utilizadas para avaliar a diversidade de *B.sorokiniana*. Oliveira et al.(2002) e Muller et al. (2005), com a análise de RAPD, observaram níveis de variabilidade genética entre os isolados revelando um grande polimorfismo entre os mesmos. Iram & Ahmad (2004), para avaliar a diversidade de *B.sorokiniana*, utilizaram a técnica de RAPD e obtiveram padrões de fragmentos que possibilitaram o agrupamento dos isolados. Nascimento & Van Der Sand (2008), analisando os polimorfismos das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de *B. sorokiniana*, não conseguiram agrupar os isolados por região geográfica ou tipo de hospedeiro. Oliveira et al., (2002)

analisaram as amostras através das técnicas PCR-RFLP e RAPD. O polimorfismo de tamanho observado entre as amostras da região ITS1-ITS2 e o espaço compreendido da região 5.8S do rDNA indicou diferenças genéticas entre as amostras. Jaiswal et al.(2007), em seu estudo com RAPD utilizou 20 oligonucleotídeos para identificar grupos e avaliar a diversidade genética do fungo *B.sorokiniana* e inferiu que apresentaram perfis anamórficos e polimórficos e Mothagh & Kaviani,(2008) analisaram isolados de *B. victoriae* por RAPD e os dados indicaram a correlação entre o polimorfismo e climas ou áreas.

A detecção da variabilidade genética e a caracterização de raças fisiológicas e/ou *formae speciales* são dois importantes pré-requisitos para o desenvolvimento de marcadores moleculares e de variedades resistentes à helmintosporiose.

Técnicas de biologia molecular como PCR-URP (*Universal Rice Primer*), desenvolvido a partir de seqüências repetidas do genoma do arroz (Kang et al. 2001) tem sido utilizadas para caracterizar genomas de diversos organismos (Kang et al, 2002; Kang et al., 2003). O URP-PCR utiliza oligonucleotídeos longos (20 nucleotídeos), condições de alta adstringência e com alta reprodutibilidade na reação. Dados obtidos em estudos com microrganismos sugerem que URP-PCR é uma ferramenta potencialmente valiosa para caracterizar grupamentos inter e intra específicos em diferentes níveis tanto em fungos quanto bactérias associados a medicina, agricultura, indústria e diferentes áreas ambientais. Kang et al.(2001) examinaram a aplicabilidade dos oligonucleotídeos para amostras diversificadas, incluindo

plantas, animais e microrganismos. De 12 oligonucleotídios testados, foi possível obter perfis de polimorfismo, devido à sua aplicabilidade universal, a técnica foi nomeada como *primer universal rice* (URP).

Os resultados do PCR “fingerprinting” utilizando o oligonucleotídeo URP-2R com uma variedade de amostras de DNA resultaram em fragmentos múltiplos, variando em tamanho de 100 pb a mais de 3.000 pb, dados que incluem DNA de espécies eucarióticas, 14 plantas diferentes, quatro mamíferos, insetos, peixes, aves e quatro espécies de fungos e duas bactérias (Kang et al.2001). Os fragmentos resultantes da amplificação em espécies de fungos e bactérias foram bem definidos em comparação com os em plantas e animais. Kang et al. (2001) concluíram que oligonucleotídeos URP podem ser universalmente utilizados para impressões digitais de genomas de organismos procaríotos e eucariotos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Culturas Fúngicas

Para realização do presente estudo, foram empregados 20 isolados de *Bipolaris sorokiniana*, obtidos a partir de sementes de trigo de diferentes regiões do Brasil e de outros países (Tabela 1), oriundos da coleção de isolados do Laboratório de Microbiologia da UFRGS, CNPT- Embrapa - Passo Fundo e isolados cedidos pelo CIMYTT- México.

3.2 Obtenção de culturas monoconidiais

Para obtenção das culturas monoconidiais, inoculou-se as culturas policonidiais em placas contendo meio ágar água. Estas foram incubadas durante 7 dias a 28⁰C, para favorecer a esporulação do fungo. A partir dessas placas, foram coletados três conídios de cada cultura com auxílio de uma agulha de vidro e inoculados em meio BDA (Ágar batata dextrose) para obtenção de culturas monoconidiais. Atribuindo-se a cada esporo uma letra (A, B e C), totalizando 60 culturas monoconidiais. Os isolados foram mantidos sob refrigeração a 4⁰C.

Tabela 1. Origem dos Isolados de *Bipolaris sorokiniana*

Número	Código do Isolado	Localização / Estado / País
01	98011	Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul
02	98012	Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul
03	980 13	Vitória, Paraná
04	98017	Samambaia, Paraná
05	98023	Vitória, Paraná
06	98026	Piratini, Rio Grande do Sul
07	98030	Cruz Alta, Rio Grande do Sul
08	98032	Engenheiro Beltrão, Paraná
09	98034	Vitória, Paraná
10	98041	Vitória, Paraná
11	98043	Pelotas, Rio Grande do Sul
12	NRRL 5851	África do Sul
13	BS15M2	Delicias, Chihuahua- México
14	BS16M1	Delicias, Chihuahua- México
15	BS18M2	Poza Rica, Veracruz- México
16	BS52M1	Monterrey, Nuevo Leon- México
17	CS10 04	Hanoi – Vietnan
18	CM01 05	Poza Rica – México
19	CF02 -01	África do Sul
20	A 20	Saskatoon- Canadá

3.3 Micélio para extração do DNA genômico

Para obtenção da massa micelial, os isolados foram inoculados em Erlenmeyer contendo 150 mL de meio BD (caldo batata dextrose, 20% batata, 2% dextrose e água destilada para completar o volume) por um período de 10 dias à temperatura de 28^o C ou até atingirem, aproximadamente, 10 a 20 g de peso de massa micelial.

3.4 Extração do DNA genômico

Para este propósito foi utilizado o protocolo desenvolvido por Ashktorab e Cohen (1992), com adaptações. A massa micelial de cada isolado foi filtrada e lavada por três vezes em água destilada estéril e o excesso de água foi retirado com um papel filtro. O micélio foi pesado e macerado adicionando-se nitrogênio líquido até obter-se um pó fino. O pó resultante da maceração foi transferido para tubos Falcon e acrescido de tampão de extração (Tris-HCL 200mM pH 8,0, NaCl 250mM, EDTA 25mM pH 8,2, 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 10 µL/mL de β- mercaptoetanol (sigma) e 50 µg/mL de proteinase k na proporção 20mg/mL tampão/pó micelial). O material foi incubado em banho-de-água a 64°C por 60 minutos, centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos e o sobrenadante transferido para tubos limpos. O procedimento para extração do DNA foi repetido duas vezes com um volume de fenol para cada volume de sobrenadante. Os tubos foram gentilmente invertidos para homogeneizar as duas fases e então centrifugados a 5.000 rpm, por 20 minutos. A fase aquosa coletada foi transferida para tubos limpos e o

procedimento de extração foi repetido três vezes com fenol/clorofórmio na proporção de ½ volume e centrifugados e finalmente uma etapa de um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) submetendo-se novamente a centrifugação por 20 minutos. O DNA foi precipitado com a adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de álcool isopropílico resfriado a -20°C. O DNA precipitado foi coletado com um bastão de vidro, transferido para um tubo falcon, lavado com 1 mL de etanol 70% e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. Depois de seco a temperatura ambiente, o DNA foi ressuspenso em 500µL água milli-Q.

3.5 Quantificação DNA

Para quantificar o DNA genômico, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8% (100mL de TE 1X e 10mg/mL de brometo de etídio) e DNA λ na concentração de 502µg/mL foi utilizado como padrão. Para tanto quatro diluições do DNA padrão foram realizadas com aproximadamente 251, 125, 62 e 31 µg/mL. O DNA diluído mais as amostras de DNA dos isolados foram submetidos à eletroforese por 30 minutos a 70 V. O gel foi observado em transiluminador sob luz ultravioleta (UV). O DNA dos isolados foi comparado com as diluições do DNA λ e estocado a - 20°C.

3.6 Amplificação do DNA genômico utilizando PCR-URP

Para amplificação dos fragmentos foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores URP (*Universal Rice Primer*) contendo 20 mer, oriundos de

seqüências repetidas do genoma do arroz, descritos por Kang et al. (2001) conforme (Tabela 2). As reações foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 50 ng de DNA genômico, 1U *Taq* DNA-polimerase, 4mM de MgCl₂, 0,2 mM dos oligonucleotídeos iniciadores, 2,5mM dNTPs, 10 mM Tris.HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 200ng/ µL BSA (*Bovine Serum Albumin*) e água milli-Q estéril para completar o volume.

Tabela 2. Sequência de Oligonucleotídeos URP

Oligonucleotídeos	Sequências (5'-3')	GC (%)	Tm (°C)
URP1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC	50	65
URP2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG	50	67
URP2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC	50	65
URP4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC	50	66
URP6R	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC	50	65
URP9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG	50	67
URP13R	TACATCGCAAGTGACACAGG	50	68
URP17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT	55	74
URP25F	GATGTGTTCTTGGAGCCTGT	50	65
URP30F	GGACAAGAAGAGGATGTGGA	50	65
URP32F	TACACGTCTCGATCTACAGG	50	65
URP38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC	50	65

Tm – Temperatura de desnaturação

3.7 Curva padrão de uso de Cloreto de Magnésio

Como parte da padronização da reação de amplificação, foi realizada uma curva padrão de cloreto de Magnésio ($MgCl_2$) utilizando-se as concentrações de 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 e 4.0 mM. A concentração que obteve melhor resultado foi a que passou a ser utilizada nas reações.

3.8 Condições de amplificação

Todas as amplificações foram realizadas em termociclador Eppendorf com as seguintes condições de amplificação: um ciclo de desnaturação 4 min a $94^{\circ}C$, e 35 ciclos de 1 min a $94^{\circ}C$, anelamento de 1 min a $55^{\circ}C$, 2 min a $72^{\circ}C$ e um ciclo de extensão por 7 min a $72^{\circ}C$. Para a padronização da reação, diferentes temperaturas de anelamento de $50^{\circ}C$, $52^{\circ}C$, $54^{\circ}C$ e $55^{\circ}C$ foram testadas. A temperatura de $55^{\circ}C$ foi definida como padrão para as amplificações deste trabalho. Para todos os isolados foram realizadas duas repetições.

3.9 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídio, por um período de 4 horas utilizando uma voltagem a 70 volts. Foi utilizado o Ladder 100bp como marcador molecular e a resolução dos fragmentos foi observada em transiluminador sob luz UV. Os géis foram fotografados com câmara digital Kodak DC 120, através do programa Kodak 1D (versão 3.5.2).

3.10 Cálculo de peso molecular

O peso molecular dos fragmentos obtidos da amplificação foi calculado utilizando-se regressão de potência, onde o peso molecular dos fragmentos obtidos com a amplificação do DNA foi estimado medindo-se a distância de migração de cada fragmento amplificado comparado com a curva padrão realizada com o marcador Ladder. Os resultados destes cálculos geraram matrizes binárias utilizadas para a realização da análise estatística, onde foram considerados 1 ou 0 para presença ou ausência de determinado fragmento de PCR-URP.

3.11 Análise estatística

As matrizes binárias foram analisadas através do software SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) versão 11.5, a partir das quais foram determinados os coeficientes de similaridade e construídos os dendrogramas das distâncias genéticas entre os isolados. A similaridade entre estes foi avaliada por simples associação e a distância genética avaliada através da Distância Euclidiana. Os agrupamentos foram realizados por UPMGA (*Unweight Pair Group Using Average*), o qual tem como premissa considerar todos os caracteres com a mesma importância para a formação do agrupamento.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das culturas monoconidiais

A partir dos isolados polispóricos oriundos de sementes trigo, foram obtidas três culturas monospóricas em que foram atribuídas as letras A, B e C, totalizando 60 culturas monoconidiais, com o propósito de diferenciar os isolados oriundos de cada conídio que foi separado da cultura polispórica. Neste trabalho alguns isolados apresentaram morfologia e coloração diferenciada quando comparados as culturas dos diferentes conídios da mesma cepa polispórica. Segundo Poloni et al. (2008), estudando a variabilidade morfológica de culturas policonidiais e monoconidiais de *B. sorokiniana* em diferentes meios de cultura, foi observada uma alta taxa de variabilidade morfológica nos diferentes meios de cultivo e que esta variabilidade era freqüente até mesmo nas diferentes repetições das culturas policonidiais. Já as culturas monoconidiais não apresentaram diferença significativa na taxa de crescimento e variabilidade morfológica quando cultivadas nos diferentes meios de cultivo. Neste mesmo trabalho os autores sugerem uma investigação diversidade genética.

4.2 Padronização da reação de PCR

4.2.1 Concentração de Cloreto de magnésio

Com o objetivo de padronizar a concentração de alguns dos componentes da reação de PCR foram realizadas curvas onde a variável era o cloreto de magnésio ($MgCl_2$), utilizando-se as concentrações de 1,0 1,5 2,0 3,0 e 4,0 mM. A concentração que obteve melhor resultado na reação de PCR foi a concentração de 4 mM e, portanto, passou a ser a concentração utilizada nas reações de amplificação do DNA. O cloreto de magnésio atua com um cofator da enzima *taq* DNA polimerase e auxilia a dissolver os dNTPs.

4.2.2 Concentração de BSA

Outra substância utilizada na reação de PCR foi o BSA. Para tanto, foi realizada uma curva para a padronização da melhor concentração de BSA. Foram testadas as concentrações de 100, 150 e 200ng. As amplificações que mostraram o melhor resultado continham 200ng de BSA. O BSA auxilia na estabilidade da enzima *taq* DNA polimerase e dos oligonucleotídeos iniciadores.

4.3 Amplificações do DNA genômico dos isolados de *B.*

sorokiniana

O DNA genômico extraído dos 60 isolados de *B. sorokiniana* foi submetido à amplificação por PCR e foram utilizados 12 oligonucleotídeos iniciadores. A técnica de PCR-URP demonstrou ser um método reproduzível e possuir uma excelente definição de fragmentos. Kang et al. (2003), nos

trabalhos desenvolvidos em que utilizou 25 isolados de seis espécies diferentes de *Alternaria* e os oligonucleotídeos URP para detectar polimorfismos entre as espécies, determinou que oito oligonucleotídeos URP que poderiam ser utilizados para revelar níveis de polimorfismo intra e inter-específicos de isolados de *Alternaria*. A utilização do RAPD, com seqüências curtas (10 *mer*) e arbitrárias de nucleotídeos, consistem em um técnica versátil (Williams et al, 1990), porém é um método que gera uma problemática, em relação a reprodutibilidade, causada por algumas condições como o alto número de ciclos utilizados e a baixa temperatura de anelamento. Ao contrário, da técnica de PCR-URP que utiliza longos oligonucleotídeos iniciadores (20 *mer*), e permite uma temperatura de anelamento bem superior a utilizada comumente na técnica de RAPD.

As amplificações utilizando os 12 oligonucleotídeos e os 60 isolados geraram fragmentos que variaram de 2018 a 100 pb. No entanto, para análise de polimorfismo no presente trabalho somente foram considerados os fragmentos com peso molecular inferior a 1,5 kb pois estes garantem uma maior reprodutibilidade. Alguns isolados não amplificaram quando submetidos às reações de URP/PCR, mesmos após várias repetições da reação, mostrando efetivamente a ausência de homologia para estes oligonucleotídeos iniciadores ou as condições de temperatura para estes isolados podem ser diferentes da temperatura padronizada.

Dos 33 isolados do Brasil, 17 (51%) não amplificaram com pelo menos um dos oligonucleotídeos iniciadores. O isolado 98011A não amplificou com 11 oligonucleotídeos e ambos isolados 98012C e 98030A não

amplificaram com nove oligonucleotídeos, sendo estes os isolados que amplificaram com o menor número de oligonucleotídeos nas condições estabelecidas.

Um único isolado, 98034A não amplificou com nenhum oligonucleotídeos iniciadores utilizados (Tabela 3). Existe a possibilidade de ocorrer uma amplificação em condições diferentes daquelas utilizadas no presente trabalho, onde se optou uma temperatura mais alta de anelamento o que melhora a especificidade dos oligonucleotídeos com o DNA dos isolados. Um fato interessante é que os demais isolados (B e C) oriundos do mesmo isolado polispórico não tiveram problemas de amplificação.

Em relação aos 27 isolados provenientes de Coleções Internacionais, 14(52%) não amplificaram com pelo menos um oligonucleotídeo iniciador. O isolado BS15M2B, amplificou com menor número de oligonucleotídeos, somente com quatro, e os isolados A 20A, A20B e A20C, com cinco oligonucleotídeos utilizados.

Tabela 3. Isolados de *Bipolaris sorokiniana* que não apresentaram produto de amplificação e o percentual de amplificação com cada os oligonucleotídeos iniciadores URP

Oligos	Brasil	Outros países	% Amplificaram
URP1F	98012C, 98030A, 98034A	BS15M2B, A20A, A20B, A20C	88,33
URP2F	98011A, 98012C, 98023A, 98034A, 98034C	BS15M2B, BS52M1A, BS52M1B, A20A, A20B, A20C	81,67
URP2R	98011A, 98012B, 98012C, 98030A, 98032B, 98034A, 98043B	BS15M2B, BS52M1A, CMO105A, A20A, A20B, A20C	78,33
URP4R	98011A, 98012B, 98012C, 98030A, 98032B, 98034A, 98034C		88,33
URP6R	98011A, 98012C, 98032A, 98034A	BS15M2B	91,67
URP9F	98011A, 98012C, 98030A, 98034A, 98043B	BS15M2B, BS16M1B, A20A, A20B, A20C	83,33
URP13R	98011A, 98011B, 98011C, 98012B, 98012C, 98023A, 98023B, 98030A, 98030B, 98032A, 98032B, 98034A	NRRL5851B, BS52M1A, BS52M1B, A20A, A20B, A20C	70,00
URP17R	98011A, 98030A, 98034A, 98034B, 98034C	BS15M2B	90,00
URP25F	98011A, 98012B, 98012C, 98017B, 98023A, 98030A, 98032A, 98034A	NRRL5851A, NRRL5851C, BS15M2A, BS15M2B, BS52M1A, BS52M1B, A20A, A20B, A20C	71,67
URP30F	98011A, 98030A, 98034A		95,00
URP32F	98011A, 98011C, 98012C, 98017B, 98017C, 98030A, 98030B, 98034A, 98034B	BS15M2B, BS15M2C, BS52M1A, BS52M1B, CS1004A, A20A, A20B, A20C	71,67
URP38F	98011A, 98012B, 98032A, 98034A	BS52M1A, BS52M1B	90,00

De acordo com Aggarwal et al, (2009) em estudo realizado com PCR-URP, utilizando os mesmos 12 oligonucleotídeos iniciadores para caracterizar *Bipolaris sorokiniana*, oriundos da Índia, somente dois oligonucleotídeos não foram capaz de amplificar os isolados do fungo. As condições de solo e ambiente podem ser determinantes para os resultados

encontrados por Aggarwal na Índia em relação aos isolados do Brasil, resultados como o número de isolados amplificados com os oligonucleotídeos iniciadores e também o perfil de diversidade.

Na tabela 3, podemos observar que os oligonucleotídeos URP-30F, URP-6R, URP-17R e URP- 38F mostraram-se mais eficientes, apresentando um maior percentual de isolados com produto de amplificação, com 95, 91,67 e 90% respectivamente.

As reações de PCR realizadas com os oligonucleotídeos URP-1F e URP-4R também apresentaram elevado índice de isolados que geraram produto de amplificação (88,33%), em que 1F amplificou maior número de isolados do Brasil e da mesma forma URP-4R para os isolados de Coleções Internacionais. Em contrapartida, os oligonucleotídeos URP-13R, URP- 25F e URP-32F, não foram tão eficazes, apresentando um índice menor de amplificação com 70 e 71,67% para oligonucleotídeos iniciadores. De acordo com os resultados obtidos por Aggarwal et al (2008), destacam os oligonucleotídeos URP-13R, URP-32F e 25F por não amplificarem o DNA genômico de *Chaetomium spp.*, sugerindo que tais oligonucleotídeos possam ter homologia menor com o DNA genômico do fitopatógeno.

Avaliando o número total de fragmentos gerados com cada um dos oligonucleotídeos, (Tabela 4) podemos observar uma variação de 41 a 77 fragmentos, demonstrando significativa diversidade entre os isolados. Verificamos também uma variação de fragmentos polimórficos, sendo que os oligonucleotídeos, URP-17R, URP-30F, URP-32F e URP-6R representaram 95%, 94%, 93% e 92% desses fragmentos e ainda os oligonucleotídeos URP-

1F e URP- 2F apresentaram 33% e 26% fragmentos monomórficos, sendo que o fragmento 905pb foi presente em 18 isolados e o fragmento 520,58pb em 15 isolados com a análise desses resultados não foi possível estabelecer um marcador molecular para o fitopatógeno *B. sorokiniana*, por não ocorrer o mesmo perfil monomórfico em todos os isolados empregados.

Tabela 4. Avaliação do número e tamanho dos fragmentos gerados em *Bipolaris sorokiniana* com 12 oligonucleotídeos iniciadores

Oligonucleotídeos	Fragmentos Gerados	Número Total de Fragmentos Gerados	Nro. de Fragmentos Polimórficos	(%) Nro. de Fragmentos Polimórficos
URP1F	1 à 14	76	50	66%
URP2F	1 à 9	66	49	74%
URP2R	1 à 12	69	59	86%
URP4R	1 à 9	71	60	85%
URP6R	2 à 15	77	71	92%
URP9F	1 à 10	60	51	85%
URP13R	1 à 12	59	51	86%
URP17R	1 à 12	62	59	95%
URP25F	2 à 11	48	39	81%
URP30F	1 à 11	63	59	94%
URP32F	1 à 10	41	38	93%
URP38F	1 à 12	48	42	88%

De acordo com Aggarwal et al. (2008), estudando isolados de *Chaetomium spp*, (*C. globosum*, *C. reflexum* e *C.perlucidum*) usando URP-PCR, dos 12 oligonucleotídeos utilizados, nove destes indicaram padrões de polimorfismo em *Chaetomium spp*, O oligonucleotídeo URP -2R produziu fragmentos uniformes para todos os isolados de *C. globosum*, sendo possível

diferenciar *C. perlucidum* e *C. reflexum*, sugerindo a utilização desse oligonucleotídeo como um marcador molecular.

Os resultados obtidos por Argharwal et al.(2009) no estudo com *B.sorokiniana* utilizando PCR-URP determinou URP-2F o oligonucleotídeo com maior número de fragmentos monomórficos, diferente dos resultados obtidos neste estudo que URP- 1F foi o oligonucleotídeo com maior índice (44%) de fragmentos monomórficos.

Os resultados obtidos com o oligonucleotídeo URP-1F demonstram uma grande variação no tamanho dos fragmentos de DNA gerados, de 100 a 2kb. e em relação ao número de fragmentos por isolados, que variaram de 1 a 14 fragmentos. Podemos observar com oligonucleotídeo URP -1F uma diversidade genômica até mesmo entre os isolados monospóricos (A, B, C), apresentando padrões intraespecíficos distintos como pode ser observado nos produtos de amplificação apresentados na Figura 1. Perfis diferentes para os isolados 98026B/ 98026C e 98032B/ 98032C podem ser observados.

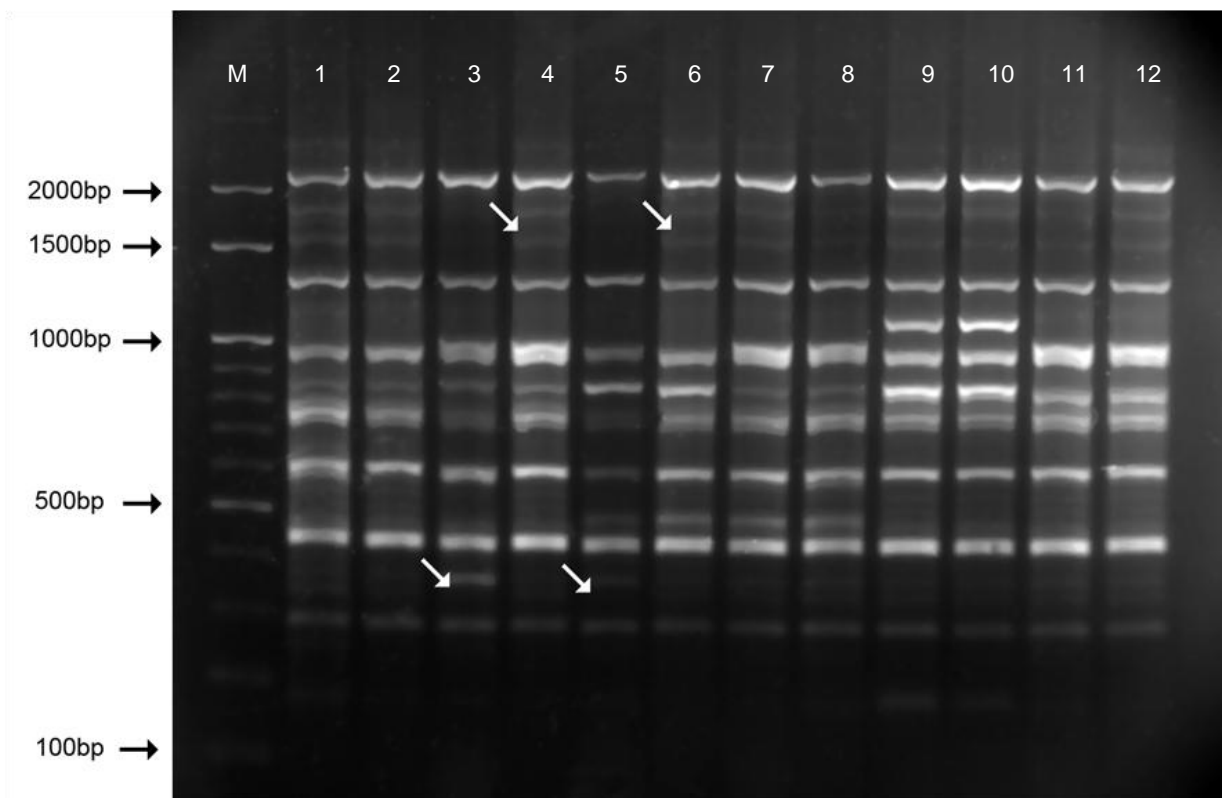


Figura 1 – Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de *B. sorokiniana* com oligonucleotídeo iniciador URP-1F. Gel de agarose 1,5%. (M) Marcador DNA Ladder 100 bp., (1) 98013 A, (2) 98013B, (3) 98026B, (4) 98026C, (5) 98032B, (6) 98032C, (7) 98034B, (8) 98034C, (9) 98041A, (10) 98041C, (11) BS16M1A e (12) BS16M1C.

Os produtos de amplificação obtidos com o oligonucleotídeo iniciador URP-1F (Figura 2), demonstram a variabilidade entre os isolados do Brasil e Coleções Internacionais. Esse resultado nos leva novamente à discussão sobre a dificuldade de se obter um padrão que se possa utilizar como marcador nesse fitopatógeno.

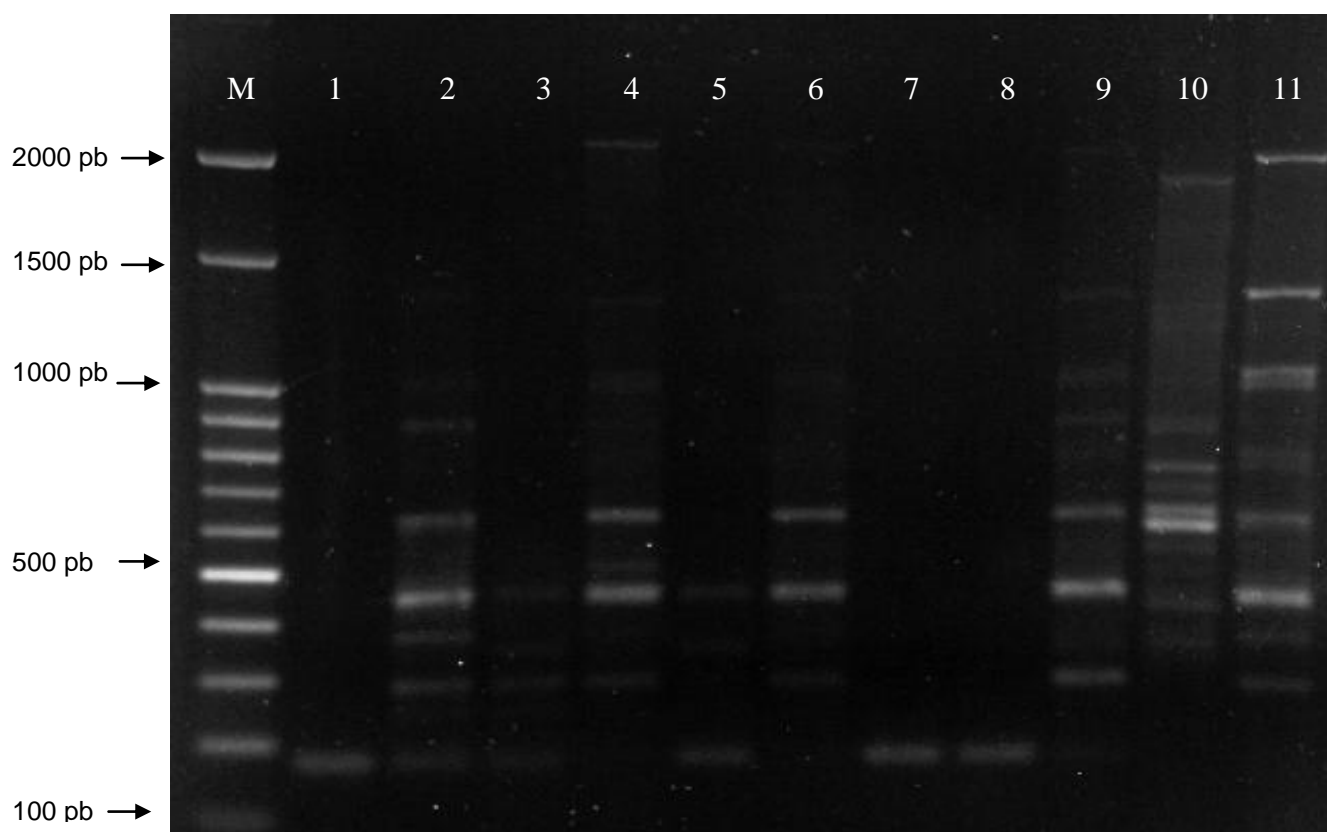


Figura 2 – Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de *B. sorokiniana* com oligonucleotídeo iniciador URP-1F. Gel de agarose 1,5%. (M) Marcador DNA Sharp 100 bp., (1) 98011 A, (2) 98011C, (3) 98012B, (4) 98030B, (5) 98032A, (6) BS15M2A, (7) BS52M1A, (8) BS52M1B, (9) CS1004A, (10) CS1004C, (11) CM0105 A.

O perfil genético gerado para as culturas monospóricas varia conforme o isolado e o oligonucleotídeo empregado, podendo ser observado perfis idênticos ou distintos.

Na figura 3, as canaletas 3 e 4, 7 e 8, 11 e 12 mostram a diversidade genética entre estas culturas monospóricas quando empregado oligonucleotídeo URP-2F, apresentam diferenças mesmo que sejam oriundos do mesmo isolado polispórico.

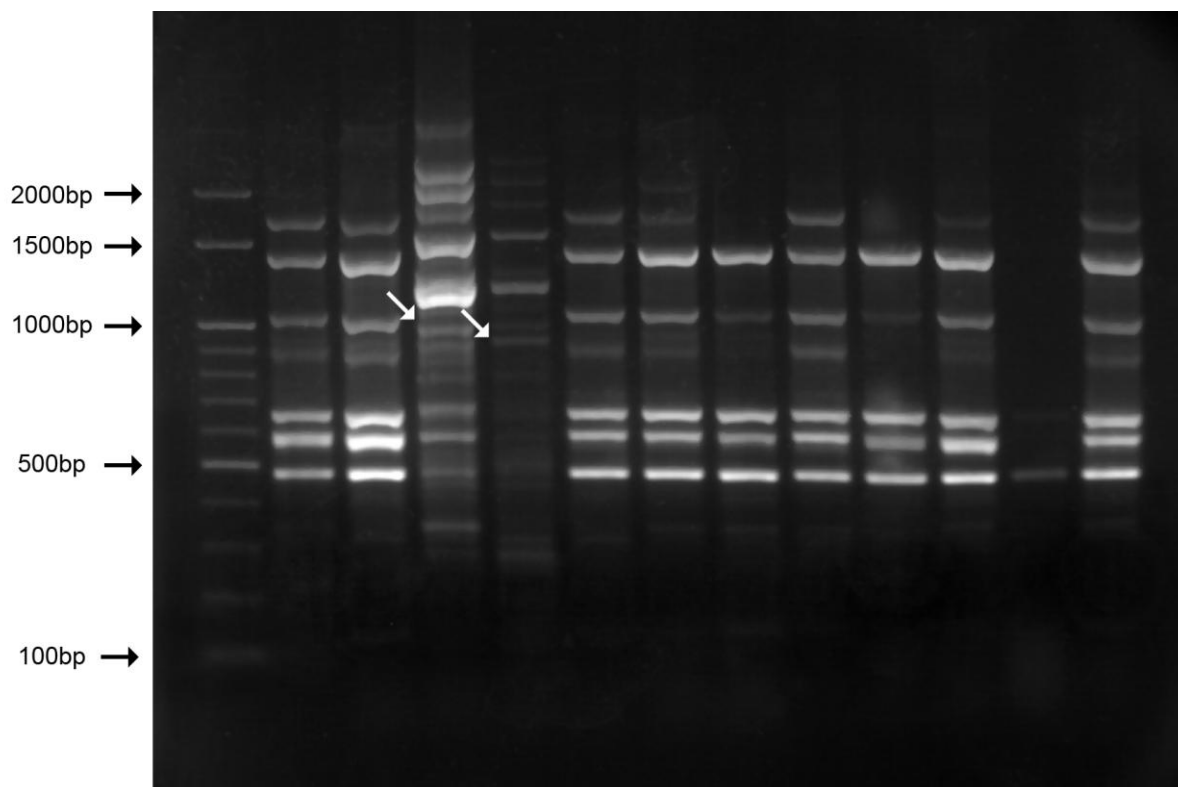


Figura 3 – Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de *B. sorokiniana* com oligonucleotídeo iniciador URP-2F. Gel de agarose 1,5%. (M) Marcador DNA *Ladder* 100 bp., (1) 98013A, (2) 98013B, (3) 98017A, (4) 98017B, (5) 98023B, (6) 98023C, (7) 98026B, (8) 98026C, (9) 98030A (10) 98030C (11) 98032B (12) 98032C.

Os oligonucleotídeos URP- 17R, URP-30F, URP- 32F e URP-6R, apresentaram índices de fragmentos polimórficos de 95%, 94%, 93% e 92% respectivamente, tais oligonucleotídeos poderiam ser utilizados como uma ferramenta para determinar a variabilidade e diversidade dos isolados de *Bipolaris sorokiniana*.

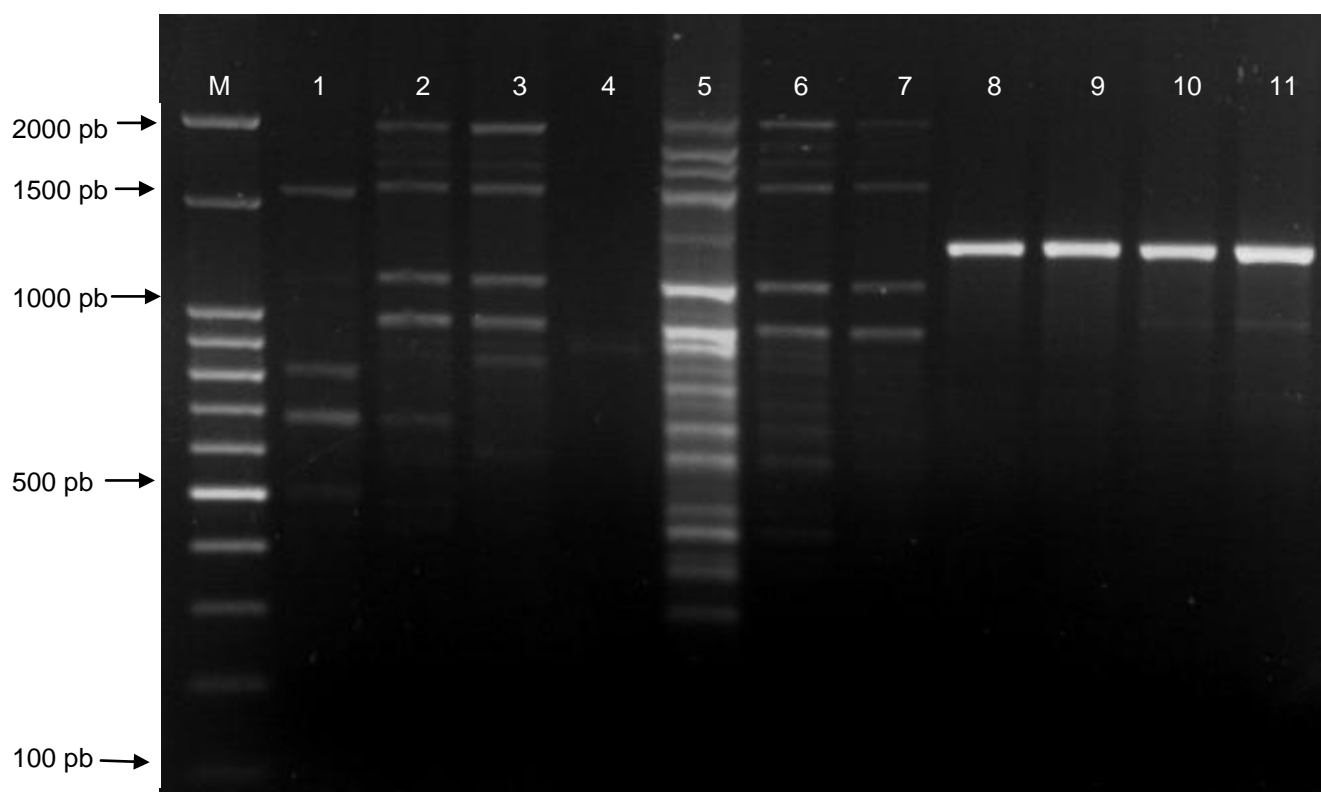


Figura 4 – Produto da amplificação do DNA genômico dos isolados monospóricos de *B. sorokiniana* com oligonucleotídeo iniciador URP-30F. Gel de agarose 1,5%. (M) Marcador DNA *Ladder* 100 bp., (1) 98017C, (2) 98023B, (3) 98030C, (4) 98032A, (5) BSM18M2B (6) BSM18M2C, (7) BS52M1C, (8) NRRL5851A, (9) NRRL5851B (10) NRRL5851C (11) NRRL5851C.

Os isolados 98017A, 98017B e 98017C, em uma análise comparativa entre todos oligonucleotídeos, (Figura 4) se destacam pela variabilidade em relação a todas as amplificações, possuindo um perfil de fragmentos completamente distintos entre si. Muller et al (2002) estudando a variabilidade morfológica e genômica, na caracterização de culturas polispóricas de *Bipolaris sorokiniana*, utilizando RAPD, observaram que o isolado 98017 uniu-se aos demais grupos com coeficiente de similaridade

muito baixo, em função dos distintos padrões de RAPD obtidos com os trinta oligonucleotídeos iniciadores testados.

Poloni et al (2008) no estudo da virulência e variabilidade fisiológica de *B. sorokiniana*, constataram que o isolado 98017 diferenciou-se dos demais nos testes de atividade enzimáticas, apresentando altos índices de atividade para a enzima esterase. Deste modo, sugere-se que o isolado 98017 possui um polimorfismo altamente significativo observado nos diferentes trabalhos e confirmado pela variabilidade morfológica e índices expressivos dos ensaios enzimáticos.

Dos 12 oligonucleotídeos URP utilizados no estudo com a amplificação de 60 isolados de *B.sorokiniana*, avaliando todos os fragmentos com peso molecular inferior a 1,5 kb, resultou em um perfil de 100% de polimorfismo para todos isolados não sendo possível determinar um marcador molecular para o fitopatógeno.

4.4 Análise do dendrograma formado a partir dos dados do URP/ PCR dos isolados de Coleções Internacionais com todos os oligonucleotídeos

Os produtos de amplificação de URP-PCR dos isolados oriundos de Coleções Internacionais com os 12 oligonucleotídeos iniciadores geraram um dendrograma que se encontra na Figura 5. As amplificações resultantes dos 27 isolados com todos os oligonucleotídeos iniciadores produziram perfis de fragmentos que geraram uma matriz de similaridade, por simples associação com um intervalo de 0.631 a 0.999 de similaridade. Analisando o dendrograma

formado com os 27 isolados, pode-se observar que 18 deles formaram grupos com os três conídios (A, B,C) isolados da mesma cepa polispórica.

Os isolados A20A, A20B, A20C (grupo 1) formaram um grupo com um alto índice de similaridade, porém estes isolados amplificaram apenas três oligonucleotídeos (Tabela 3), possivelmente por apresentaram um baixo índice de homologia com os oligonucleotídeos utilizados ou pelas condições de amplificação que não favoreceram a amplificação do genoma. Analisando o grupo 4, os isolados CMO105A, CMO105B, CMO105C agruparam-se com um nível de similaridade de 0,908 e 0,954; onde já se pode observar pelos resultados que existe uma variabilidade entre os conídios mas ainda estes permanecem bastante próximos. O grupo 9 formado pelos isolados CS1004A, CS1004B, CS1004C já possui um nível de similaridade um pouco menor 0,830 – 0,868.

O grupo da África, NRRL5851A, NRRL5851B, NRRL5851C (grupo 5) possui similaridade de 0,842 a 0,908, o que os mantêm agrupados, porém, existe dissimilaridade entre os conídios, os isolados CFO2A, CFO2B e CFO2C (grupo 7), também pertencentes a África possuem um nível de similaridade de 0,885 e 0,936 entre si e ainda quando comparados com o grupo 5, essa similaridade fica em torno de 0,733 e 0,756, indicando que não é possível de estabelecer relação com a região geográfica de origem destes grupos.

Os isolados BS52M1A e BS52M1B (México) possuem um nível de similaridade de 0,979 de similaridade e agrupam-se ao isolado BS15M2B (México) com um índice de aproximadamente 0,92 (grupo 2), formando um grupo de isolados diferentes com um nível de similaridade maior do que entre

os aquele que se originaram da mesma cepa polispórica. O BS18M2B e BS18M2C se diferenciaram com uma similaridade de 0,822 e quando comparados ao isolado BS18M2A o índice de similaridade diminui para 0,765, não sendo possível reuni-lo aos isolados B e C, desta forma o isolado BS18M2A forma um grupo isolado.

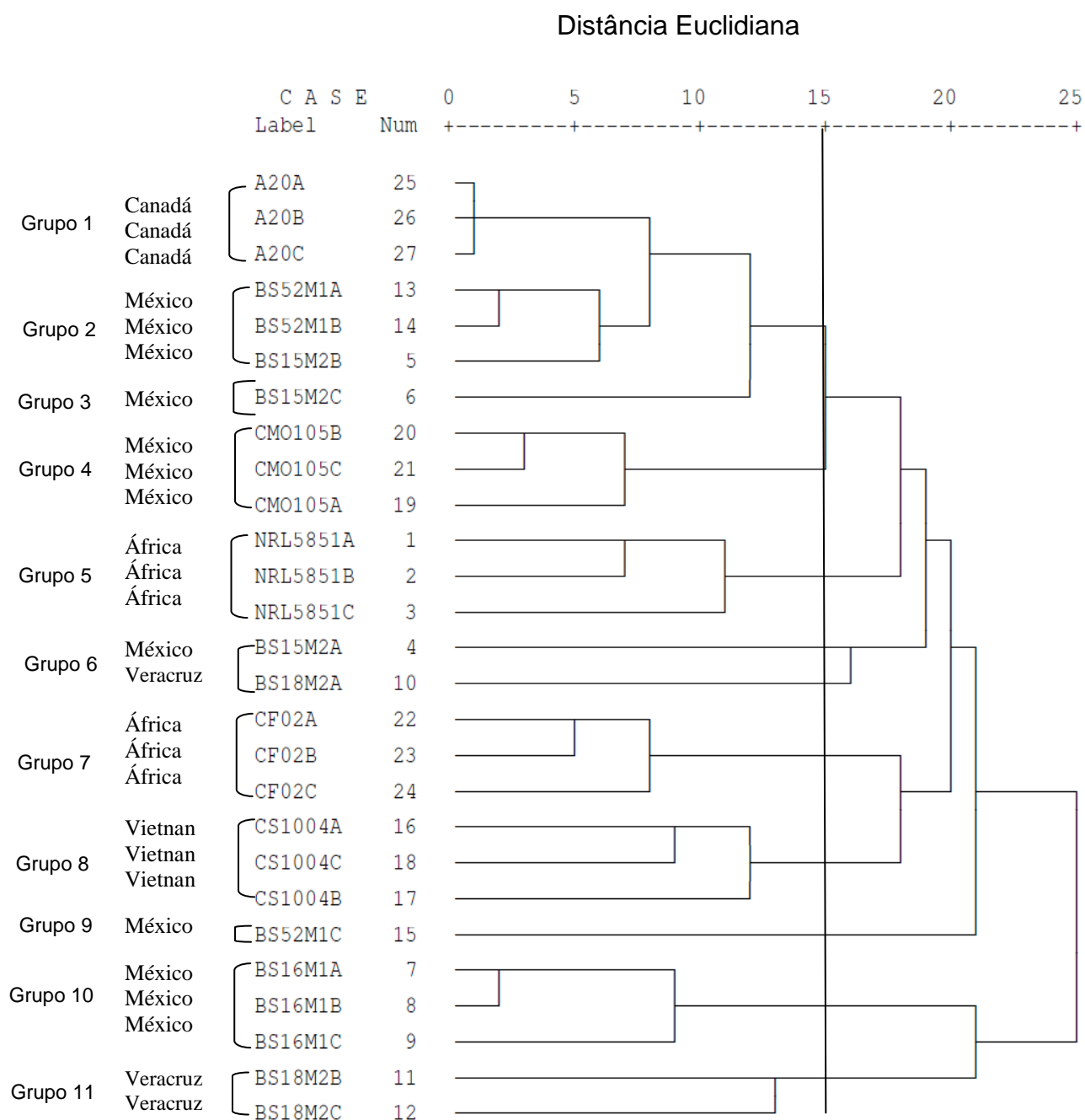


FIGURA 5: Dendrograma dos isolados de Coleções Internacionais utilizando “UPGMA”.

Segundo Nascimento & Van Der Sand (2008), em análise da região ITS1 e ITS2 do rDNA de isolados de *B. sorokiniana*, os resultados obtidos na análise dos dendrogramas constataram que não foi possível agrupar os isolados de coleções internacionais por região geográfica.

4.5 Análise do dendrograma formado a partir dos dados de URP/ PCR com todos os isolados do Brasil e todos os oligonucleotídeos

A análise dos dendrogramas empregando 33 isolados do Brasil com todos os oligonucleotídeos apresentaram índices de similaridade que variam de 0,7374 a 0,998, formando 7 grupos distintos. Os isolados 98043A, 98043B, 98043C do grupo 1 agruparam-se com 0,982 de similaridade entre os isolados A e B, já o isolado C o índice de similaridade baixou para 0,962 em relação ao A e B. Os isolados 98013A, 98013B, 98013C (grupo 5) da mesma forma os conídios A e C obtiveram 0,980 de similaridade enquanto o conídio B o índice foi de 0,888 em relação ao A e B. Os isolados 98026A, 98026B, 98026C (grupo 7) A e B quando comparados entre si resultaram em 0,975 de similaridade e o conídio C obteve 0,899 em relação a A e B.

Os isolados 98023B, 98023C, com índice de 0,90 entre si e agruparam-se com 98012A (grupo 2) com índice de similaridade em torno de 0,865, mas ainda assim demonstraram semelhança no perfil desse isolados. Ao analisarmos o agrupamento formado pelos isolados 98012B e C, pode-se observar que os mesmos encontram-se inseridos no grupo 1 e o índice de similaridade destes ultrapassa os 90% com alguns dos isolados deste grupo.

Observando os isolados 98034B, 98034C, 98032B, 98032C que formam o grupo 3, o índice de similaridade é menor, porém o grupo se forma com o isolado 98032C agregando-se aos demais com um índice de similaridade de 0,829.

Na análise de agrupamento, observa-se que o isolado 98017A não foi inserido em nenhum grupo por possuir um perfil diferenciado dos isolados do Brasil (Figura 6), não tendo sido possível correlacioná-lo aos isolados 98017B e 98017C. Dos três conídios separados da cepa 98017, o isolado A parece ser aquele com características mais variáveis.

Com os isolados do Brasil não foi possível realizar um agrupamento destes de acordo com a região geográfica de origem, os isolados apesar de pertencerem a mesma localidade, obtiveram índices de similaridade muito baixa o que os agrupou de forma aleatória, independente da região geográfica.

O trabalho realizado por Yoon & Galwe (1993), analisando a população *Hypoxyton trutucatum* de diferentes regiões utilizando RAPD, indicaram que os padrões de amplificação não correspondem à região de localização da população. Para avaliação destes resultados foram analisados os isolados com ponto de corte de 20 na régua do dendrograma de Distância Euclidiana.

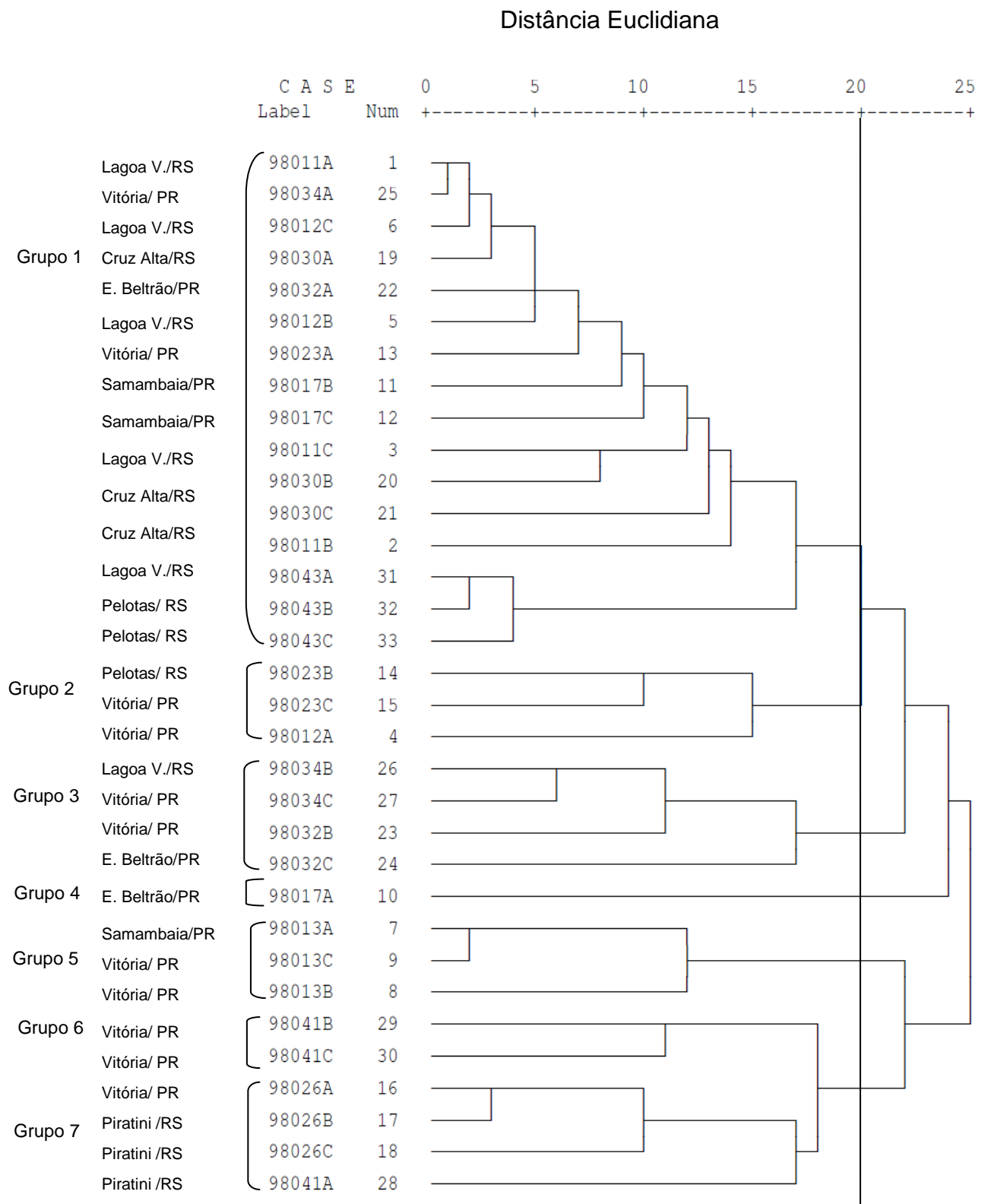


FIGURA 6: Dendrograma dos isolados do Brasil com todos os oligonucleotídeos iniciadores, gerado pela Distância Euclidiana, segundo o método “UPGMA”.

4.6 Análise do dendrograma dos dados obtidos do PCR / URP isolados do Brasil e de Coleções internacionais com todos os oligonucleotídeos

Para uma avaliação mais detalhada com relação aos agrupamentos dos isolados, foram construídos dendrogramas a partir da análise individual de cada um dos 12 oligonucleotídeos iniciadores com os isolados dos Brasil e de Coleções Internacionais (**Apêndice 8**). A Figura 7 demonstra o perfil de agrupamentos dos isolados do Brasil e de Coleções Internacionais com os 12 oligonucleotídeos iniciadores formando 13 grupos e 20 arranjos individuais.

A similaridade genética estabelecidas entre os isolados avaliados por simples associação estabeleceu um intervalo de 0,999 a 0,71. A análise do dendrograma de todos os oligonucleotídeos com isolados do Brasil e de Coleções Internacionais (Figura 7) reproduziu praticamente a mesma disposição quando comparados com os dendrogramas individuais dos isolados internacionais com todos os oligonucleotídeos representados pelas letras IG (Internacional Grupo) e quando comparados com os dendrogramas individuais dos isolados do Brasil formaram arranjos distintos representados no dendrograma pelas letras BG (Brasil Grupo).

Os dendrogramas individuais demonstraram uma grande diversidade, até mesmo entre os três isolados oriundos da mesma cepa polispórica em relação aos 12 oligonucleotídeos. Na Tabela 5, pode-se observar o perfil de diversidade entre os isolados e os oligonucleotídeos pelos quais foram caracterizados. A tabela foi construída a partir da matriz binária com os fragmentos mais representativos de cada isolado, gerando 52 perfis

distintos de P1 a P52. Esses por sua vez, foram agrupados por isolado, onde foi obtida a coluna do “perfil do isolado em todos oligonucleotídeos” que resultou em 60 combinações, 58 distintas e duas iguais. Com os resultados obtidos não foi possível relacionar os perfis a região geográfica de origem dos isolados.

Tal diversidade é justificada por Zeigler, (1998) infere que os principais fatores que determinam a dinâmica genética de populações são as mutações, recombinações, seleção e fluxo gênico. A recombinação aumenta a diversidade genética nas populações, rompendo as combinações genéticas já existentes e permitindo a formação de novas. Zeigler (1998) afirma também que nos ascomicetos a capacidade de recombinação sexual, e muitas vezes na reprodução assexuada pode ser complementada por recombinação parassexual, algumas espécies perdem completamente a competência sexual.

McDonald et al (1989), concluíram que o número de variações genéticas nas populações afetam a capacidade de adaptação dos patógenos às condições ambientais e que no geral as populações são altamente variáveis. Embora as taxas de mutação por locus sejam geralmente baixas, são persistentes, e em populações de patógenos existem poucas informações sobre o número de mutações.

TABELA 5. Análise dos perfis com todos os oligonucleotídeos URP

ISOLADOS	PERFIL DOS ISOLADOS EM CADA OLIGONUCLEOTÍDEO												PREFIL DO ISOLADO EM TODOS OLIGONUCLEOTÍDEOS
	URP1F	URP2F	URP2R	URP4R	URP6R	URP 9F	URP 13R	URP 17R	URP 25F	URP 30F	URP 32F	URP 38F	
98011A	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	01
98011B	P1	P10	P11	P1	P1	P22	P1	P38	P1	P11	P1	P33	02
98011C	P1	P10	P18	P23	P17	P1	P1	P1	P1	P17	P1	P33	03
98012A	P1	P11	P19	P12	P17	P22	P12	P1	P1	P35	P1	P1	04
98012B	P1	P10	P1	P1	P17	P22	P1	P1	P1	P38	P1	P1	05
98012C	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P11	P1	P1	06
98013A	P2	P12	P1	P1	P1	P31	P40	P24	P1	P39	P17	P39	07
98013B	P3	P12	P1	P1	P1	P32	P40	P24	P37	P34	P17	P39	08
98013C	P2	P12	P1	P1	P38	P32	P40	P24	P1	P39	P17	P39	09
98017A	P1	P13	P1	P17	P1	P33	P11	P17	P1	P35	P1	P11	10
98017B	P1	P1	P12	P17	P1	P34	P1	P25	P1	P35	P1	P1	11
98017C	P1	P1	P11	P1	P35	P34	P1	P25	P1	P1	P1	P1	12
98023A	P1	P1	P16	P24	P17	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	13
98023B	P1	P14	P17	P24	P31	P17	P1	P27	P1	P17	P38	P11	14
98023C	P1	P15	P17	P12	P17	P35	P11	P1	P1	P1	P17	P11	15
98026A	P2	P15	P12	P1	P6	P31	P39	P24	P16	P19	P17	P31	16
98026B	P2	P15	P12	P1	P6	P31	P39	P24	P44	P35	P17	P31	17
98026C	P2	P15	P12	P1	P6	P31	P39	P33	P44	P19	P17	P31	18
98030A	P1	P15	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P33	19
98030B	P1	P12	P18	P23	P29	P10	P1	P9	P10	P45	P1	P33	20
98030C	P1	P15	P19	P12	P1	P36	P1	P7	P10	P1	P19	P10	21
98032A	P1	P10	P11	P12	P1	P1	P1	P13	P1	P35	P17	P1	22
98032B	P3	P12	P1	P1	P9	P31	P1	P12	P11	P38	P17	P17	23
98032C	P4	P10	P11	P11	P37	P31	P11	P13	P1	P46	P17	P1	24
98034A	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	P1	01
98034B	P2	P10	P11	P25	P31	P12	P8	P1	P44	P21	P1	P17	25
98034C	P2	P1	P11	P1	P31	P37	P8	P1	P24	P10	P17	P17	26
98041A	P2	P1	P14	P1	P31	P33	P41	P27	P44	P34	P49	P39	27
98041B	P1	P11	P14	P10	P12	P33	P1	P1	P1	P12	P1	P12	28
98041C	P5	P1	P14	P1	P31	P33	P1	P24	P1	P34	P1	P12	29
98043A	P1	P1	P13	P8	P17	P1	P12	P29	P42	P10	P50	P46	30
98043B	P1	P1	P1	P8	P17	P1	P12	P29	P42	P10	P50	P46	31
98043C	P1	P1	P20	P8	P17	P1	P21	P29	P42	P1	P50	P46	32
NRL5851A	P6	P1	P13	P1	P13	P1	P1	P1	P1	P9	P1	P1	33
NRL5851B	P6	P16	P13	P1	P10	P1	P1	P1	P1	P9	P1	P1	34
NRL5851C	P7	P16	P17	P1	P10	P1	P1	P19	P1	P9	P1	P10	35
BS15M2A	P1	P17	P13	P8	P17	P1	P1	P42	P1	P37	P49	P0	36
BS15M2B	P1	P1	P1	P8	P1	P1	P1	P1	P1	P37	P1	P46	37
BS15M2C	P1	P17	P18	P6	P19	P1	P1	P1	P10	P37	P1	P46	38
BS16M1A	P5	P1	P13	P1	P31	P38	P40	P24	P42	P44	P1	P31	39
BS16M1B	P5	P1	P13	P1	P31	P1	P40	P24	P7	P44	P1	P31	40
BS16M1C	P8	P1	P10	P1	P31	P38	P32	P17	P42	P24	P51	P31	41
BS18M2A	P1	P11	P10	P26	P1	P34	P12	P43	P42	P11	P11	P46	42
BS18M2B	P9	P1	P21	P1	P1	P34	P39	P17	P44	P23	P51	P46	43
BS18M2C	P9	P11	P22	P1	P1	P34	P1	P17	P42	P35	P51	P46	44
BS52M1A	P1	P1	P1	P27	P1	P1	P1	P1	P1	P35	P1	P1	45
BS52M1B	P1	P1	P17	P27	P1	P1	P1	P1	P1	P35	P1	P1	46
BS52M1C	P1	P11	P1	P27	P1	P1	P35	P1	P42	P35	P15	P1	47
CS1004A	P1	P11	P1	P1	P29	P1	P12	P1	P1	P47	P1	P1	48
CS1004B	P1	P11	P1	P1	P1	P38	P14	P1	P42	P1	P52	P1	49
CS1004C	P1	P11	P1	P1	P30	P1	P1	P33	P16	P47	P52	P1	50
CMO105A	P1	P16	P1	P28	P1	P1	P35	P1	P42	P13	P25	P1	51
CMO105B	P1	P17	P18	P28	P29	P1	P35	P1	P42	P13	P25	P1	52
CMO105C	P1	P16	P18	P28	P29	P1	P35	P1	P42	P13	P25	P1	53
CF02A	P1	P11	P1	P28	P1	P34	P35	P1	P1	P1	P1	P1	54
CF02B	P1	P11	P17	P28	P1	P34	P35	P1	P1	P1	P9	P38	55
CF02C	P1	P11	P17	P28	P1	P34	P35	P1	P1	P1	P9	P1	56
A20A	P1	P1	P1	P1	P29	P1	P1	P1	P1	P48	P1	P14	57
A20B	P1	P1	P1	P1	P29	P1	P1	P1	P1	P21	P1	P14	58
A20C	P1	P1	P1	P1	P29	P1	P1	P1	P1	P21	P1	P14	59

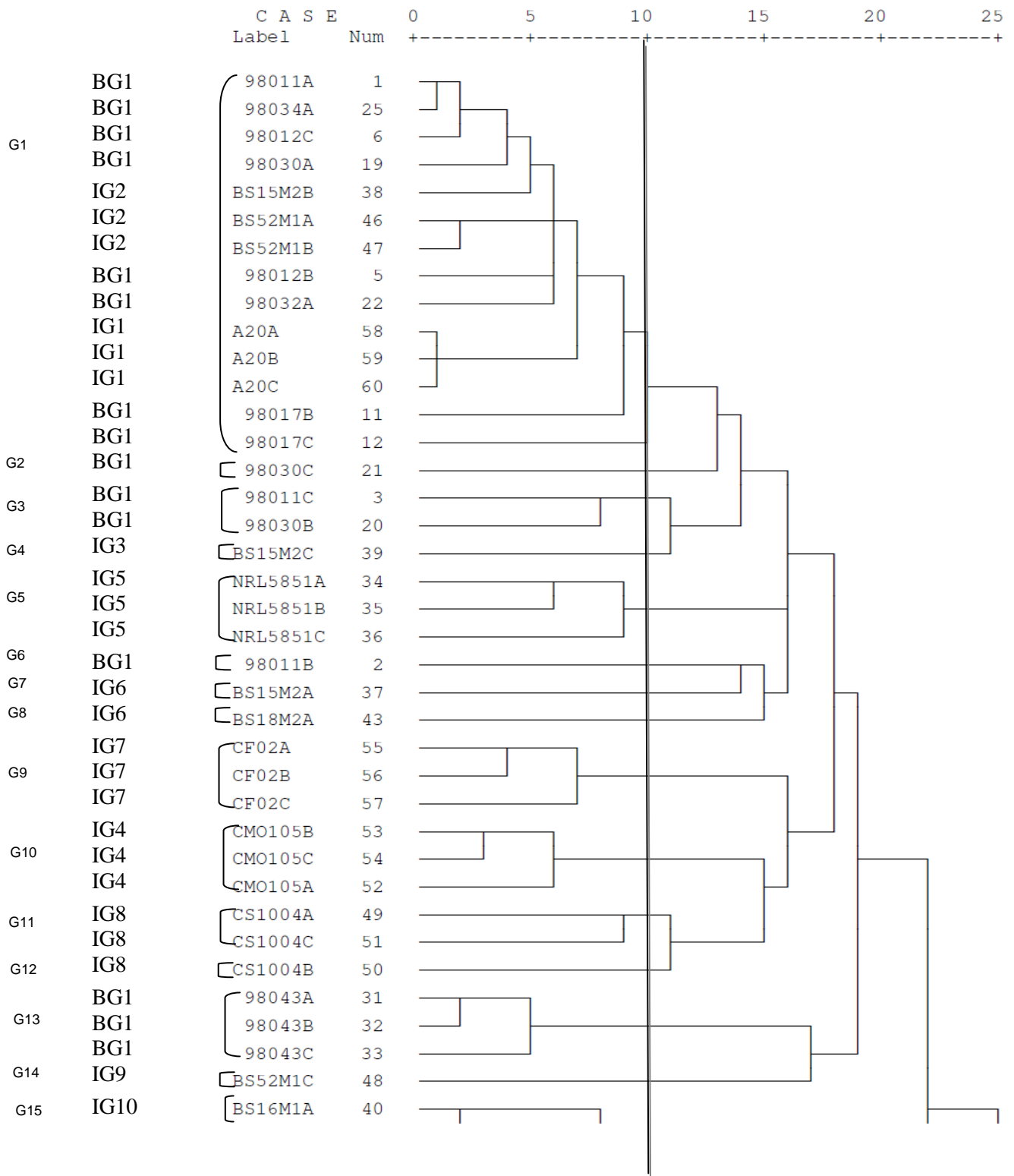
Williams et al (1990), revela que alterações nucleotídicas, deleções e inserções nos sítios de iniciação podem resultar em polimorfismo do DNA, detectáveis pela técnica de RAPD. Muller et al (2000), em seu estudo da variabilidade morfológica, relatou que a condição multinucleada das células do micélio e conídios de *B.sorokiniana*, com subsequente heteriocariose, poderia levar a combinação mitótica e a novos arranjos por haploidização, estariam contribuindo para o polimorfismo detectado no DNA deste fitopatógeno.

No trabalho realizado com o fitopatógenos *B. sorokiniana*, por Muller et al (2002), utilizando um número reduzido de isolados gerou um número restrito de variáveis utilizadas na matriz binária, dados que para análise taxonômica foram pouco conclusivos. No presente trabalho, os padrões de agrupamento resultantes das análises demonstraram um comportamento diferenciado, gerando muitas variáveis na construção da matriz binária, conseqüente os agrupamentos hierárquicos demonstraram um perfil diversificado dentro dos grupos e entre as cepas monospóricas.

Tais comportamentos poderiam ser justificados também pelo perfil de cada região, estudos realizados pela (EMPRAPA, 2002) determinam que a região Sul, Centro-Sul e região- Central do Brasil são consideradas regiões potencialmente tritícolas, sendo que os solos possuem características que os diferenciam como excesso de alumínio na região Sul que causam uma doença fisiológica conhecida como crestamento questão esta contornada pela inserção de cultivares resistentes. Outros fatores que contribuem para esta diversidade são os índices de pH, ambiente, umidade de cada região, favorecendo uma maior variabilidade e resultando em maiores dificuldades para o controle do

fitopatígeno no Brasil. As regiões brasileiras possuem uma grande diversidade, fato este pode ser constatado pela seleção de áreas mais adequadas para a plantio do trigo, porém, não é possível estabelecer um comparativo entre isolados do Brasil e os isolados de Coleções Internacionais, como diversidade e formação de grupos, em função do desconhecimento de características determinantes já citados anteriormente (solo), que podem influenciar diretamente na incidência deste fitopatígeno. Com os resultados obtidos no presente trabalho em que foi observada uma importante diversidade até mesmo entre conídios de *B.sorokiniana*, sugerem que mais trabalhos sejam realizados para um efetivo controle da doença.

Distancia Euclidiana



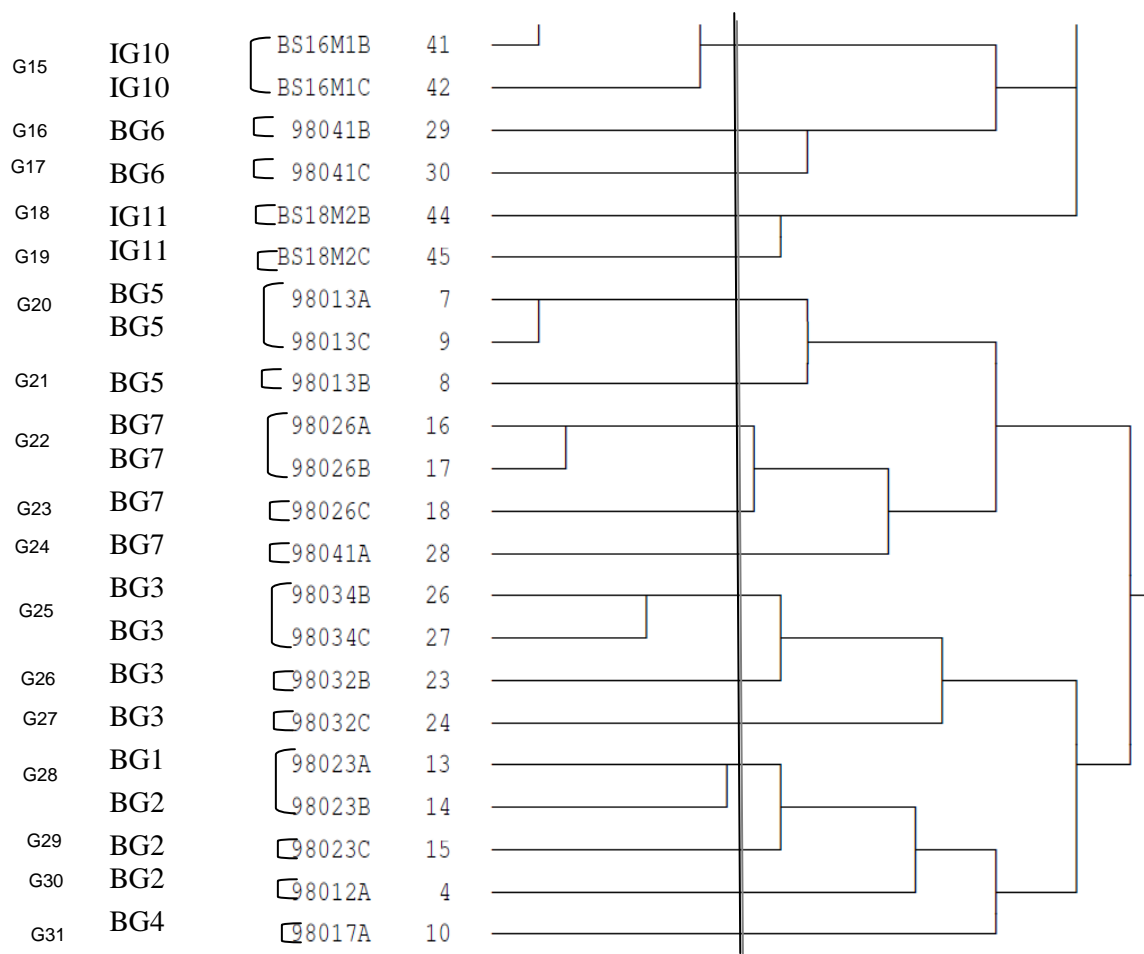


FIGURA 7: Dendrograma dos isolados do Brasil e de Coleções Internacionais com todos os oligonucleotídeos iniciadores, gerado pela distância Euclidiana segundo o método “UPGMA” onde G (G1 a G31) grupamentos formados. BG- Grupo formado nos dendrogramas com isolados do Brasil e todos oligonucleotídeos (Figura 6) e IG - Grupo formado nos dendrogramas com isolados de Coleções Internacionais e todos oligonucleotídeos (Figura 5).

5.CONCLUSÕES

A técnica de PCR–URP mostrou-se com grande sensibilidade e reprodutibilidade, permitindo avaliar o perfil de polimorfismo dos isolados monospóricos de *Bipolaris sorokiniana* deste estudo.

Os Oligonucleotídeos URP-30F, URP-6R, URP-17R e URP-38F amplificaram o maior número de isolados do Brasil, enquanto que o oligonucleotídeo URP-4R e URP-30F amplificaram maior número de isolados de Coleções Internacionais.

Os isolados apresentaram uma grande diversidade intra-específica, entre os oligonucleotídeos iniciadores URP e ainda entre os conídios monospóricos oriundos da mesma cepa polispórica.

A análise dos dendrogramas dos isolados do Brasil apresentou uma maior diversidade do que os isolados de outros países.

Não foi possível agrupar os isolados por região geográfica.

6.CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para prosseguir este estudo sugerimos que:

Verificar a resistência a fungicidas com as culturas monospóricas.

Seja realizado o estudo das regiões V3-V4 e V9 do gene 18S do rDNA e análise de isoenzimas com o objetivo de conhecer melhor a fisiologia do fungo.

Seja realizada a caracterização destes isolados através de outras técnicas moleculares como DGGE.

Seja realizado seqüenciamento dos fragmentos relevantes dos dados obtidos.

Testar a virulência com as culturas monospóricas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J; MIMS, C.W. *Introducion a la Micologia*. Barcelona. 1985. 638p

AGGARWAL, R.; SHARMA,V.; KHARBIKAR, LL.; RENU, S. Molecular characterization of *Chaetomium* species using URP-PCR. **Genetics and Molecular Biology** v.31(4): p. 943–946, 2008.

AGGARWAL, R.; SINGH,V.B.; SHUKLA, R.; GURJAR, M.S;GUPTA, S.; SHARMA,T. URP- based DNA fingerprinting of *Bipolaris sorokiniana* Isolates Causing Spot Blotch of Wheat. **Journal of Phytopathology (On line)** doi: 10.1111/j.1439-0434.2009.01603.x, 2009

ASAD.S.; IFTIKHAR S.; MUNIR. A.; AHMAD I.E.; AYUB, N. Pathogenic diversity in *Bipolaris sorokiniana* isolates collected from different wheat growing areas of the Punjab and NWFP of Pakistan. **Pakistan Journal of Botany** v.39(6) p.2225-2231, 2007

ASHKTORAB, H.; COHEN, R.J. Facile isolation of genomic DNA from filamentous fungi. **Bioresour Technology**, v.13, p.198-200, 1992.

AZEVEDO, J.L. Variabilidade em fungos fitopatogênicos. **Summa Phytopathologica**, v. 2, p.3-15, 1976.

BURDON.J.J.; SILK J., Souces and Patterns of Diversity in Plant-Pathogenic Fungi. **Centre for Plant Biodiversity Research**. Mini-Review, Austrália, Vol. 87, No. 7, p. 664-669, 1997.

CAMARGO, C. E. O.; FERREIRA-FILHO, A. W. P.; SALOMON, M. V. Temperature and pH of the nutrient solution on wheat primary root growth. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 61, n. 3, p. 313-318, 2004.

COSTA, N. Trigo: Produção Industrialização e Comercialização. Trigo e Soja. Porto Alegre, n 112 p.2-30, nov/dez 1990.

CUNHA, G.R.; TROMBINI, M.F. Trigo no Mercosul. **Embrapa**, 1999

EL-DASH, A.; MIRANDA de M. Z. Farinha integral de trigo germinado. Características Nutricionais e estabilidade ao armazenamento. **Ciencia & Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 216-223, 2002.

ELIS. M.B. *Demariaceous Hyphomycetes* Kew: Commonw Ealth Mycological Institute, 1971, 608p.

FERREIRA, R. A. Trigo: o alimento mais produzido no mundo. **Nut. Brasil**, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 45-52, 2003.

FORCELINI, C. A. Tratamento de sementes no Brasil. In: MENTEN, J. O. M. (Ed). PATÓGENOS EM SEMENTES: Detecção, Danos e Controle Químico. **ESALQ/USP**. p. 246 -264, 1995.

FRAZZON, A. P. G.; MATSUMURA, A. T. S.; VAN DER SAND, S. T. Morphological characterization and genetic analysis of *Drechslera teres* isolates. **Genetics and Molecular Biology** v .25(2), p. 235 -241, 2002.

GIECO, E. A.; DUBKOVSKY, J.; CAMARGO, L. E. A. Interaction between resistance to *Septoria tritici* and phenological stages in wheat. **Scientia Agricola, Piracicaba**, v. 61, n. 4, p. 422-426, 2004.

GUTKOSKI, L. C.; NETO, R. J. Procedimento para Teste Laboratorial de Panificação - Pão tipo Forma. **Revista Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 5, p. 873-879, 2002.

GHINI,R.; KIMATI, H. Resistência de Fungos a Fungicidas Jaguariúna: **Embrapa Meio Ambiente**, 78p. 2000.

INDICAÇÕES TÉCNICAS DA COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO- TRIGO TRITICALE- 2005. **37^o Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo**, Cruz Alta, março, 2005, 157p

IRAM,S., AHMAD,I. Divesity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat growing areas under rice-wheat cropping system in Punjab, Pakistan. **Pakistan Journal of Botany**, v. 36(2): p. 439-444, 2004.

JAISWAL, S.K.; SWETA, L.C.; PRASAD, S.; SHARMA, S.; KUMAR, S.; PRASAD, R.; PANDLEY, S. P.; CHAND, A.K.; JOSHI,A.K. Identification of molecular marker and aggressiveness for different groups of *B. sorokiniana* isolates causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Current Microbiology** v.55, p.135-141, 2007.

KANG H. W.; Park DS, GO. S-J.; EUN. M-Y. Genomic differentiation among oyster mushrooms (*Pleurotus* spp.) cultivars released in Korea by URP-PCR. **Mycobiology** v.29: p.85–89, 2001.

KANG, H-W.; PARK, D-S.; GO, S-J; EUN, M-Y. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice. **Molecular Cell** v.13, p.281-287, 2002.

KANG, H-W.; LEE, B.R.; YU., S.H.; Analysis of Genetic Relatedness in *Alternaria* species Producing Host Specific Toxins by PCR polymorphism. Korea. **The Plant Pathology Journal** v. 19(5): p.221-226, 2003.

KIMATI, H. Resistência de Fitopatógenos e substâncias Químicas usadas no controle de Doenças de Plantas. **Summa Phytopathologica**, v,22, n.1, p.79-80, 1996.

KUMAR, J.; SCHÄFER, P.; HÜCKELHOVEN, R.; LANGEN, G.; BALTUSCHAT, H.; STEIN, E.; SUBRAMANIAN, N.; KOGEL, K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: cytological and molecular approaches towards better control. **Molecular Plant Pathology**, v.3, p.185-195, 2002.

KUMAR, M.; SHUKLA, P.K. Use of PCR targeting of internal transcribed spacer regions and single stranded conformational polymorphism analysis of sequence variation in different regions of rRNA genes in fungi for rapid diagnosis of mycotic keratitis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43(2), p.662-668, 2005.

MEHTA, Y.R. Doenças do Trigo e seu Controle. São Paulo: Editora Agronômica Ceres Ltda, 1978, 190p.

MOTHAGH, M.R.S., KAVIAN, B. Study of genetic variation in population of *Bipolaris victoriae*, the causal agent of rice brown spot disease, in Guilan Province of Iran. **African Journal of Biotechnology** v.7 (22)pp. 4027-4030, 2008

MUCHOVEJ, J.J.; MUCHOVEJ, R.M.C.; RIBEIRO-NESIO, M.L. Taxonomia de *Dreschlera*, *Bipolaris* e *Esserohilum*. **Fitopatologia Brasileira**, v.13 n.3, p.211-223, 1988.

MÜLLER, M.V.G. O estudo da variabilidade morfológica e uso de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD) na caracterização de isolados de *Bipolaris sorokiniana*. Porto Alegre: Departamento de Microbiologia da UFRGS, 2000. 135 f. (Dissertação – Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000

MÜLLER, M.V.G.; GERMANI, J.C.; VAND DER SAND, S.T. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Genetics and Molecular Research**, v.4, p.642-652, 2005.

NAKAJIMA, H.; TORATSU, Y.; FUJII, Y.; ICHINOE, M.; HAMASAKI, T. Biosynthesis of sorokinianin a phytotoxin of *Bipolaris sorokiniana*: evidence of mixed origin from the sesquiterpene and TCA pathways. **Tetrahedron Letters**, v.39, p.1013-1016, 1998.

NAKAJIMA, H.; ISOMI, K.; HAMASAKI, T. Sorokinianin: a novel phytotoxin produced by phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Tetrahedron Letters**, v.35, p.9597-9600, 1994.

NASCIMENTO, E.J.M.; VAN DER SAND, S.T. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana*. **World Journal of Medical Microbiology**, v.24: 647-652. 2008.

NEERGARD, P. Seed Pathology. London **The Macmillan**. 1979. 288p.

NILSON, P.; AKESSON, H.; JASSON, H.B.; ODHAM, G. Production and release of the phytotoxin prehelminthosporol by *Bipolaris sorokiniana* during growth. **FEMS Microbiology Ecology**, v.102, 91-98, 1993

OLIVEIRA, M.A.R.de; GOMES, L.S. Avaliação da perda em Rendimento causada pela Helmitosporiose (*Helmitosporium sativum*) em Trigo. Cascavel: **OCepar**, Julho, 1984 (Boletim técnico nº 08).

OLIVEIRA R.C.B.W.; RESENDE, M.A.; VALERIO, H.M.; CALIGIORNE, R.B.; PAIVA, E. Genetic Variation Among Pathogens Causing " Helminthosporium" Diseases of Rice, Maize and Wheat. **Fitopatologia Brasileira**. v.27 n.6 Brasília nov/dec.2002

OLIVEIRA, A. M.; PRESTE, A.; MATSUMURA, A.T.; SAND, S. V.D.T.; MATTOS, G.S. Study of intraspecific variability of *Bipolaris sorokiniana* by random polymorphic DNA. **Genetics and Molecular Research**, v.1(.4), p.350-358, 2002.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. Efeito do Tratamento de Sementes com Fungicidas sobre o Controle de Doenças na Parte Aérea do Trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v.28, n.5, p.5151-520, 2003

POLONI, A.; MULLER, M.V. PESSI, I., VAN DER SAND, S.T. Analysis of morphological and growth rate variability of conidial and monoconidial cultures of *Bipolaris sorokiniana*. **Revista de Biociências**, v. 16 n. 1, 2008

PRESTES, A.M.; SANTOS, H.P.; REIS, E. M. Práticas culturais e incidência de manchas foliares em trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v.37, n.6 p.791-797, 2002

REIS, E.M., CARMONA, M., Avaliação do Potencial de Rendimento de Lavouras de Trigo com vistas ao Controle Econômico de doenças Foliares com Fungicidas. 3 ed. Passo Fundo, 2001. 28p.

REIS, E. M. Contribuição dos defensivos agrícola na proteção de plantas In: SIMPÓSIO- CONTROLE QUIMICO DE DOENÇAS DE PLANTAS. **Summa Phytopathologica**, v.22, n. 1, p.78-81, 1996.

REIS, E.M.; CASA, R.T. Doença do trigoVI –Mancha Amarela da folha. Passo Fundo: Bayer S.A., 1996. P.725-735.

SOARES, R. P. Avaliação Econômica da Política Triticola de 1967 a 1977. Brasília: **Comissão de Financiamento de Produção**, 1980.140p.(Coleção Análise de Pesquisa, 20).

TINLINE, R.D. *Cochliobolus sativus*. IV. Drug -resistant, color, and nutritionally exacting mutants. **Canadian Journal of Botany**, v.40, p.425-437, 1961.

TINLINE, R.D.; MACNEILL, B.H. Parasexuality in plant pathogenic fungi. Ann. Rev. **Phytopathology**. v.7, 147-170. 1969.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Major world crop areas and climatic profiles. World Agricultural Outlook Board, **Agricultural Handbook** N° 664, Washington D.C., 1994. 279p

YOON, C.; GLAVE,D.A. Association of random amplified polymorphic DNA markers with stomatal type in *Hypoxylon truncatum* sensu Miller. **Micologia Bronx**, v.85, p.369-380,1993.

ZEIGLER, R.S.,Recombination in *Magnaporthe Grisea*. **Annual Review of Phytopathology**. 1998. Manila, Philippines v.36:249–75

ZILLINASKY, F.J. Common Disease of Small Grains Cereals: A Guide to Identification. México: **Centro Internacional de Mejoramiento de Mis Y Trigo**, 1983, 141p.

ZYLBERSZTAJN, D.; NEVES, M.F.; ROSSO, R.M.; FERRAZ, R.M.M.; CASTRO,L.T.; MARIN, M.K.; MIZUMOTO, F.M.; CONEJERO, M.A.; FERREIRA, T.F.; ORATI, R. A. **Estratégias para o Trigo no Brasil**. São Paulo:Atlas, 2004, 224p.

WIESE, M.V, Compendium of Wheat Diseases St. Paul: The American **Phytopathological Society**, 1987, 112p.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBERLIK, A. R.; KENNERTH, J.L. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v.18, p.6231-6235, 1990.

Acesso ao site da EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária em 19.01.2010 <http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/trigo/safraRS2005.htm>

Acesso ao site da EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária em 02.04.2010 http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co98.htm

8. APÊNDICE

8.1 Meios de cultura e soluções utilizadas

8.1.1 Meio de cultura BDA

4g Infuso de batata

40g dextrose

15g Agar

Água destilada para completar 1000ml

8.1.2 Meio de cultura batata dextrose

200g batata

20g dextrose

Água destilada para completar 1000 ml

8.1.3 Tampão de extração de DNA

200 mM Tris-HCl pH 8,0

250 mM NaCl

25mM ácido etilenodiaminotetracético(EDTA)pH 8,0

1%V/V dodecil sulfato de sódio(SDS)

1%β- mercaptoetanol

8.1.4 Clorofórmio-álcool isoamílico

24 volumes clorofórmio

1 volume álcool isoamílico

8.1.5 Fenol: clorofórmio

Fenol saturado 1:1 clorofórmio armazenado a 4°C

8.1.6 Tampão de fenol (pH 8,0) para 250ml de fenol

50 ml água destilada

6 ml Tris pH 8,8

12,5 ml m-cresol

0,5 ml β -mercaptoetanol

7,5 ml NaOH 1N

Ajustar pH com pastilhas de NaOH

8.1.7 Tampão TAE 50X

242g de Tris

57,1 ml ác.acético glacial

100 ml EDTA 0,5m Ph 8,0

1000 ml água destilada

8.1.8 Tampão TAE 1X

20 ml TAE 50X

980 ml de água destilada

8.1.9 Oligonucleotídeos iniciadores

Os Oligonucleotídeos iniciadores (IDT) foram destiladas em milliQ(100ng/μl) e estacados à -20⁰C.

8.1.10 dNTPS(desoxiribonucleotídeos trifosfatados)

Os dNTPS (LUDWIG) foram diluídos a uma concentração de 2,5 mM, em cada, em água milli-Q e estocados a -200C.

8.1.11 Tampão de amostra

0,25% (p/v) azul de bromofenol

40%(p/v) sacarose em água

8.1.12 Proteinase K (fungal)

A enzima proteinase K foi dissolvida numa concentração de 20mg/ml em 10mM Tris-HCl pH8.0, 1,5 acetato de cálcio, distribuída em alíquotas de 300μl e estocadas à -200C.

8.1.13 Acetato de sódio

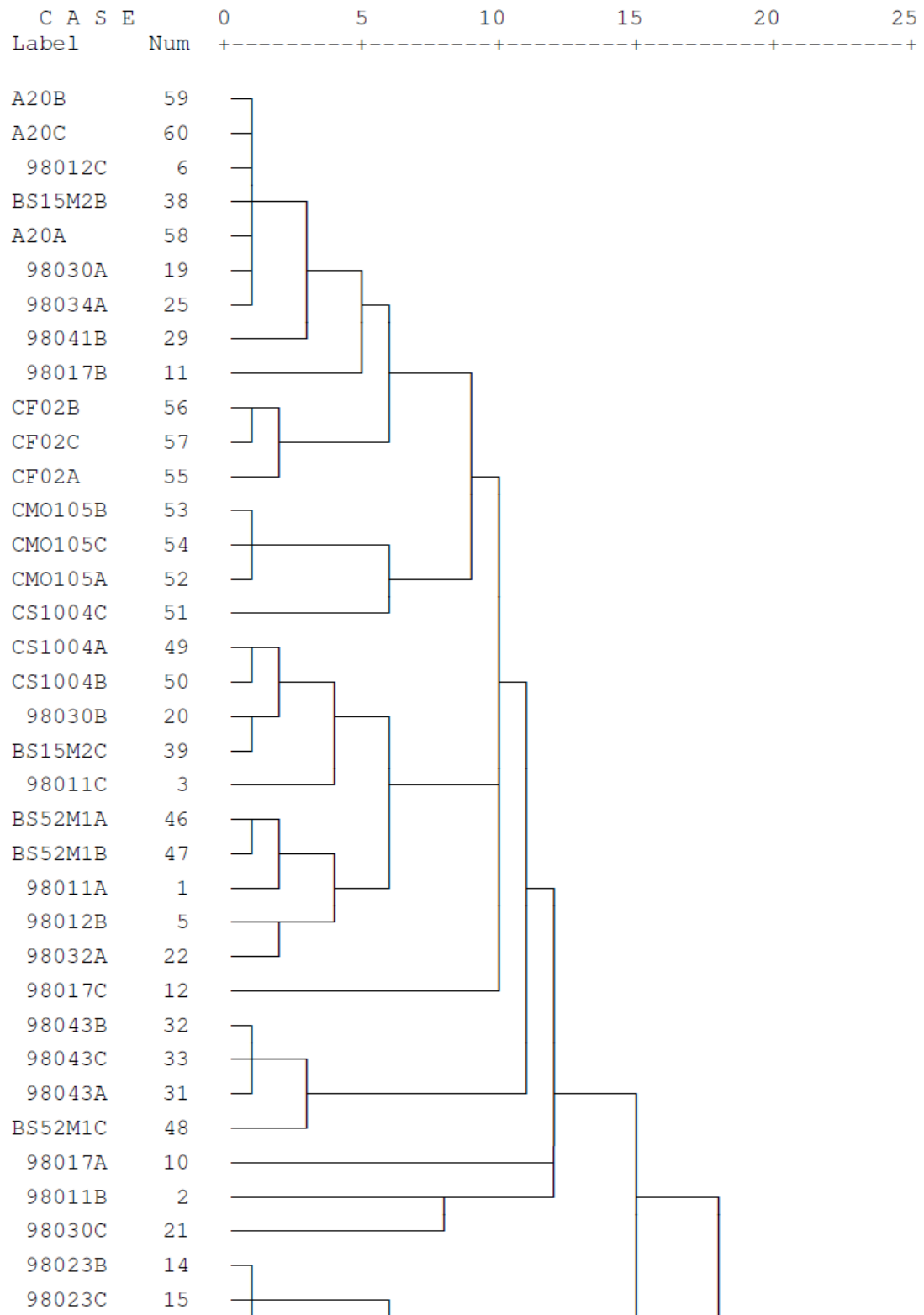
3M acetato de sódio

Água destilada para completar 1000ml

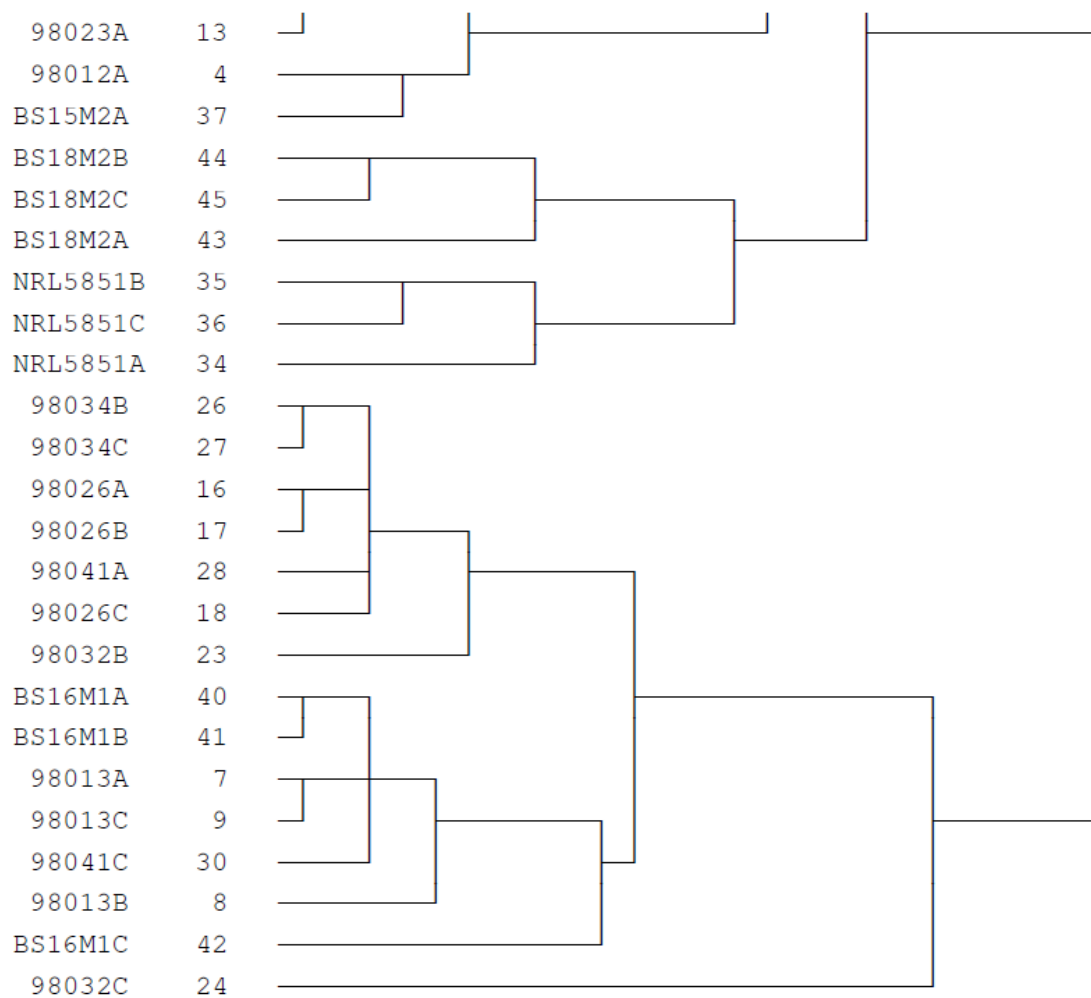
pH 5,2 ajustado com ácido acético glacial

8.2 DENDROGRAMAS

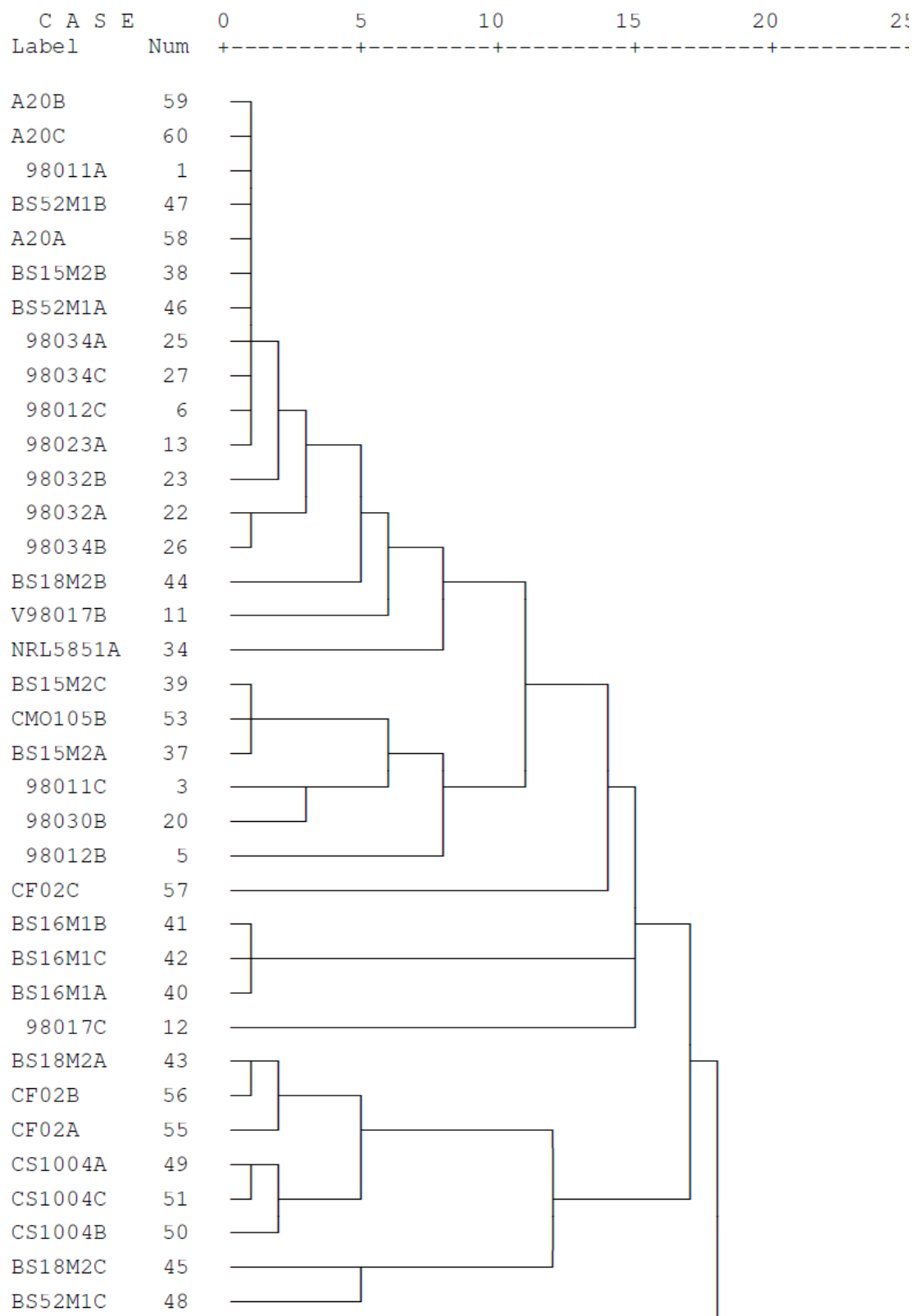
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-1F com isolados do Brasil e países.



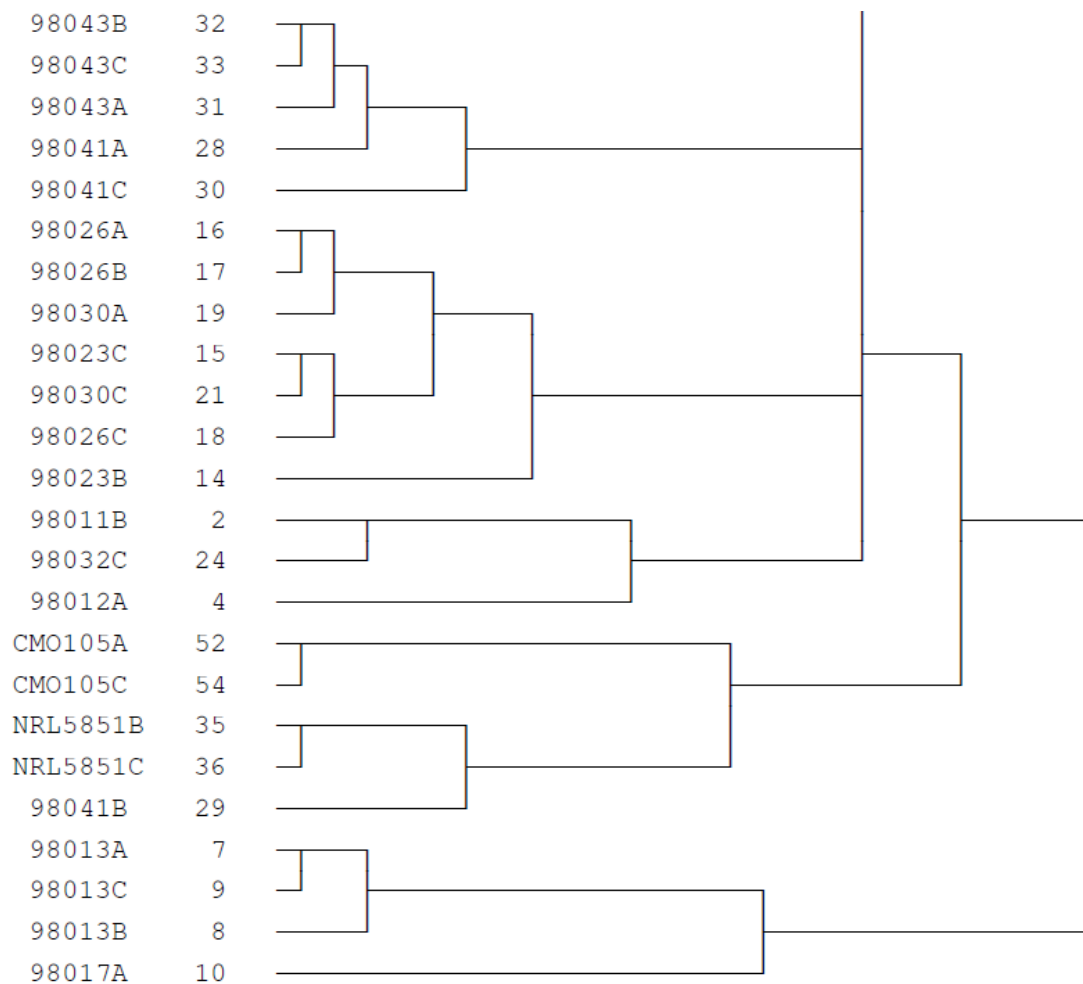
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-1F com isolados do Brasil e outros países.



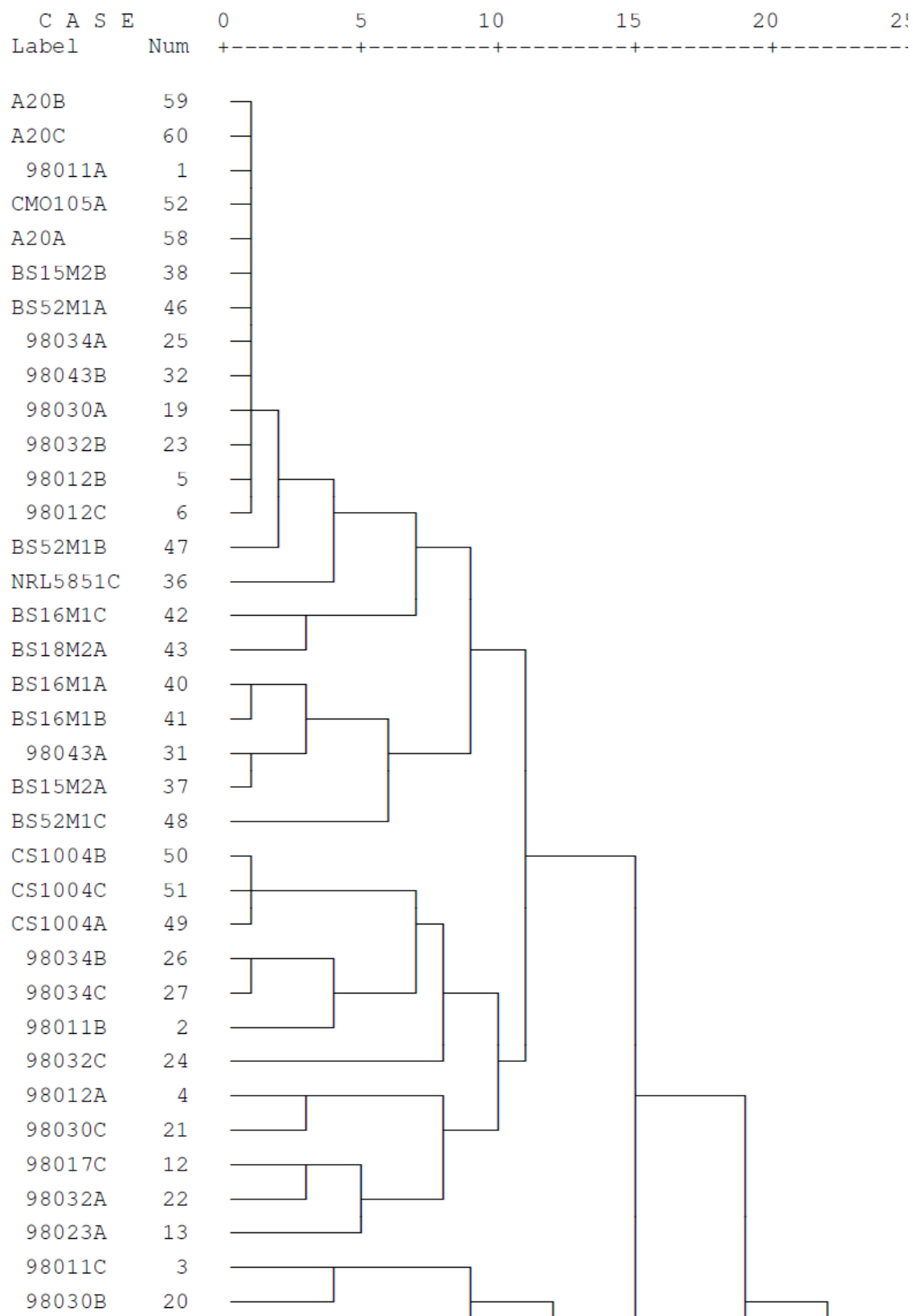
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-2F com isolados do Brasil e outros países.



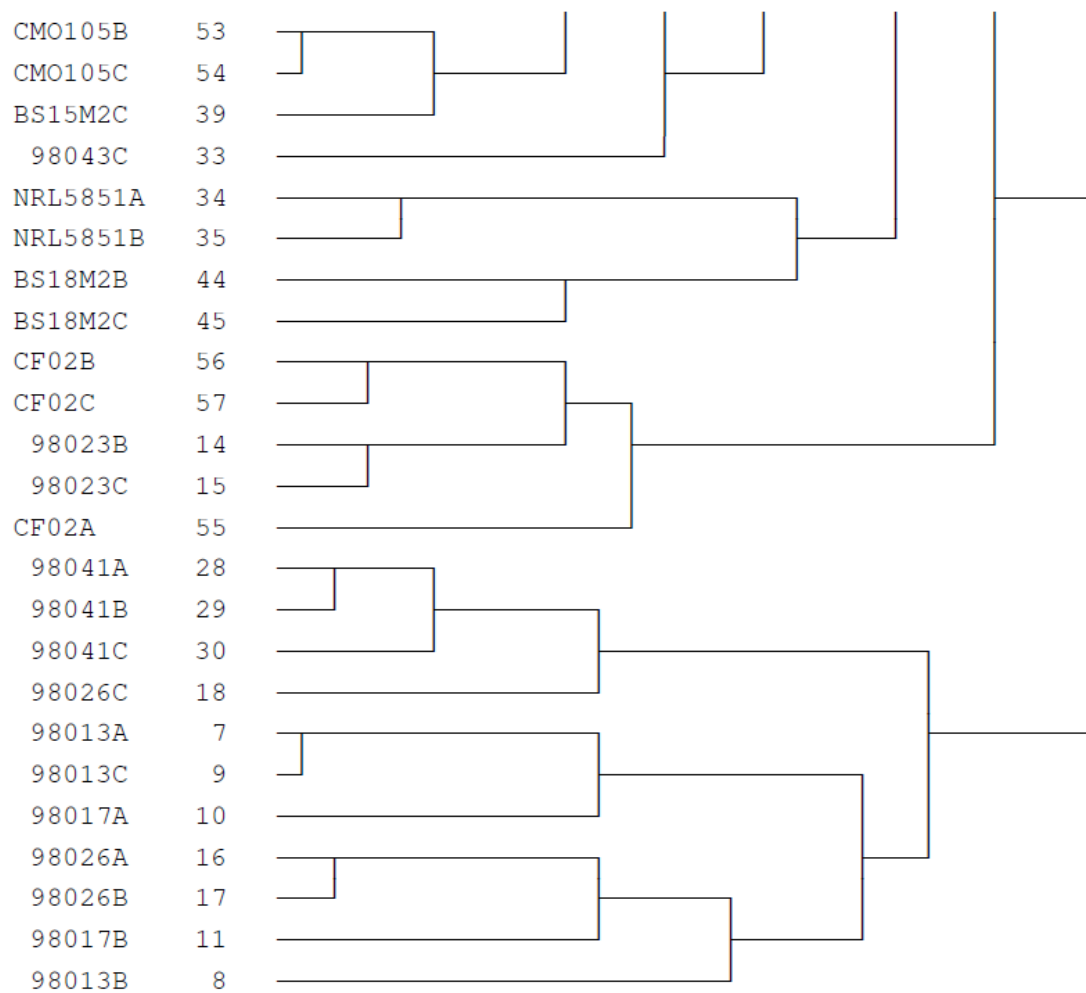
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-2F com isolados do Brasil e outros países.



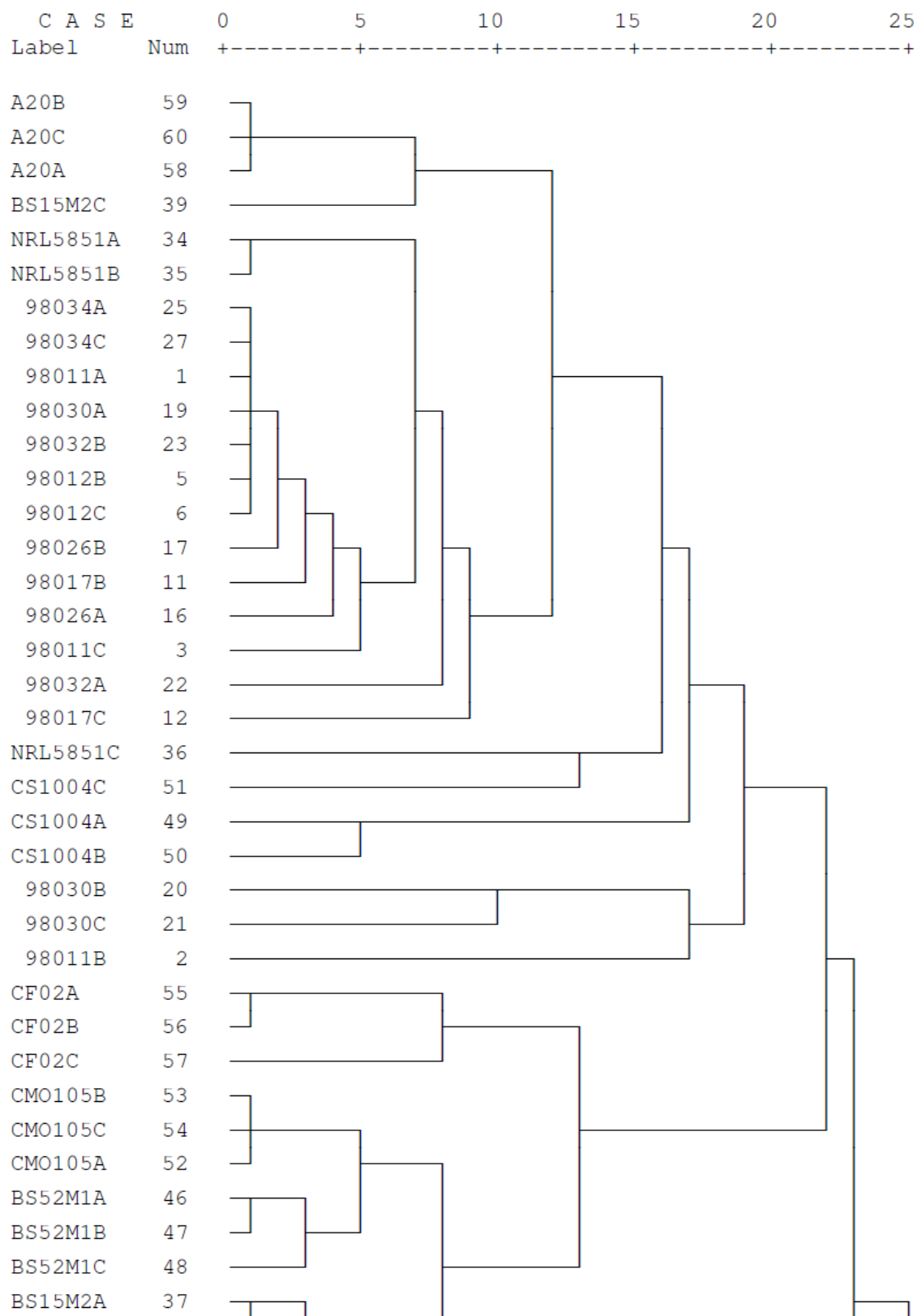
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-2R com isolados do Brasil e outros países.



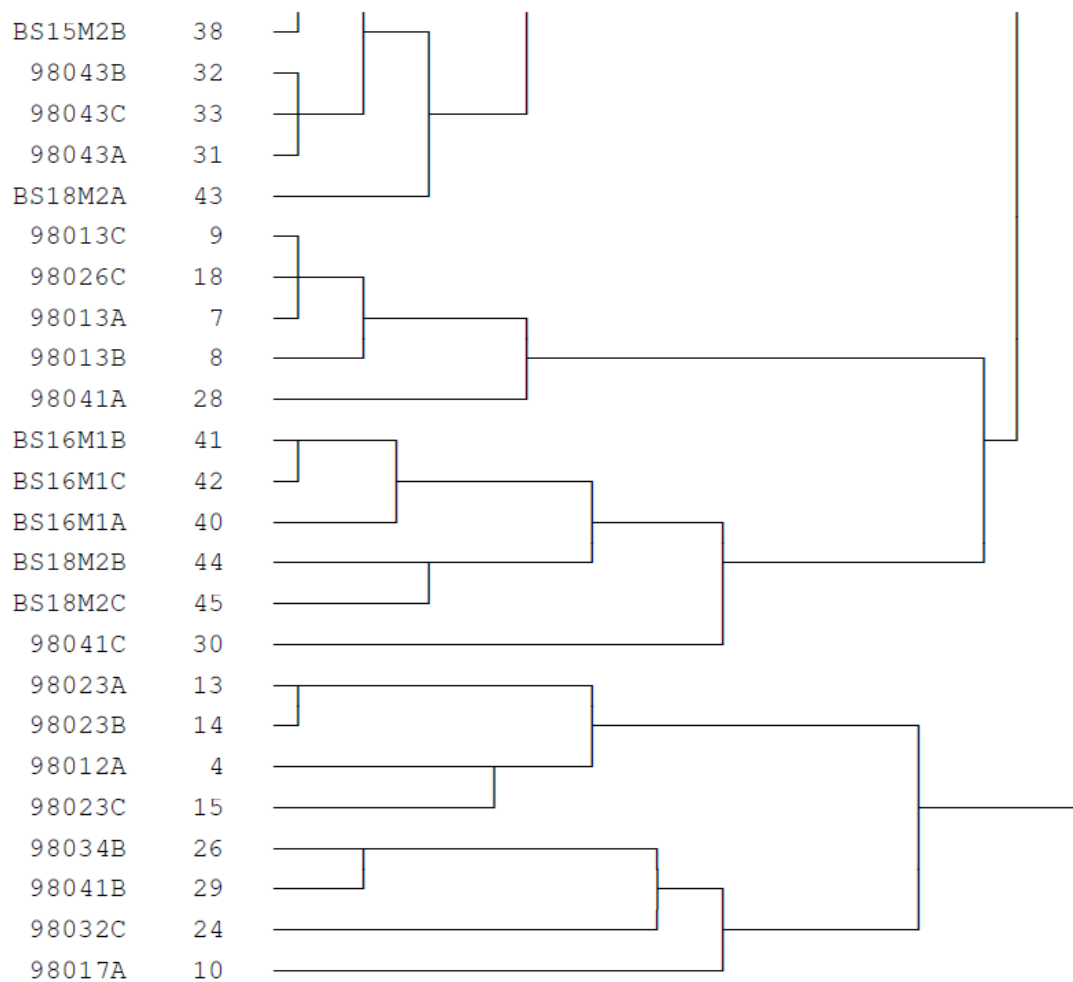
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-2R com isolados do Brasil e outros países.



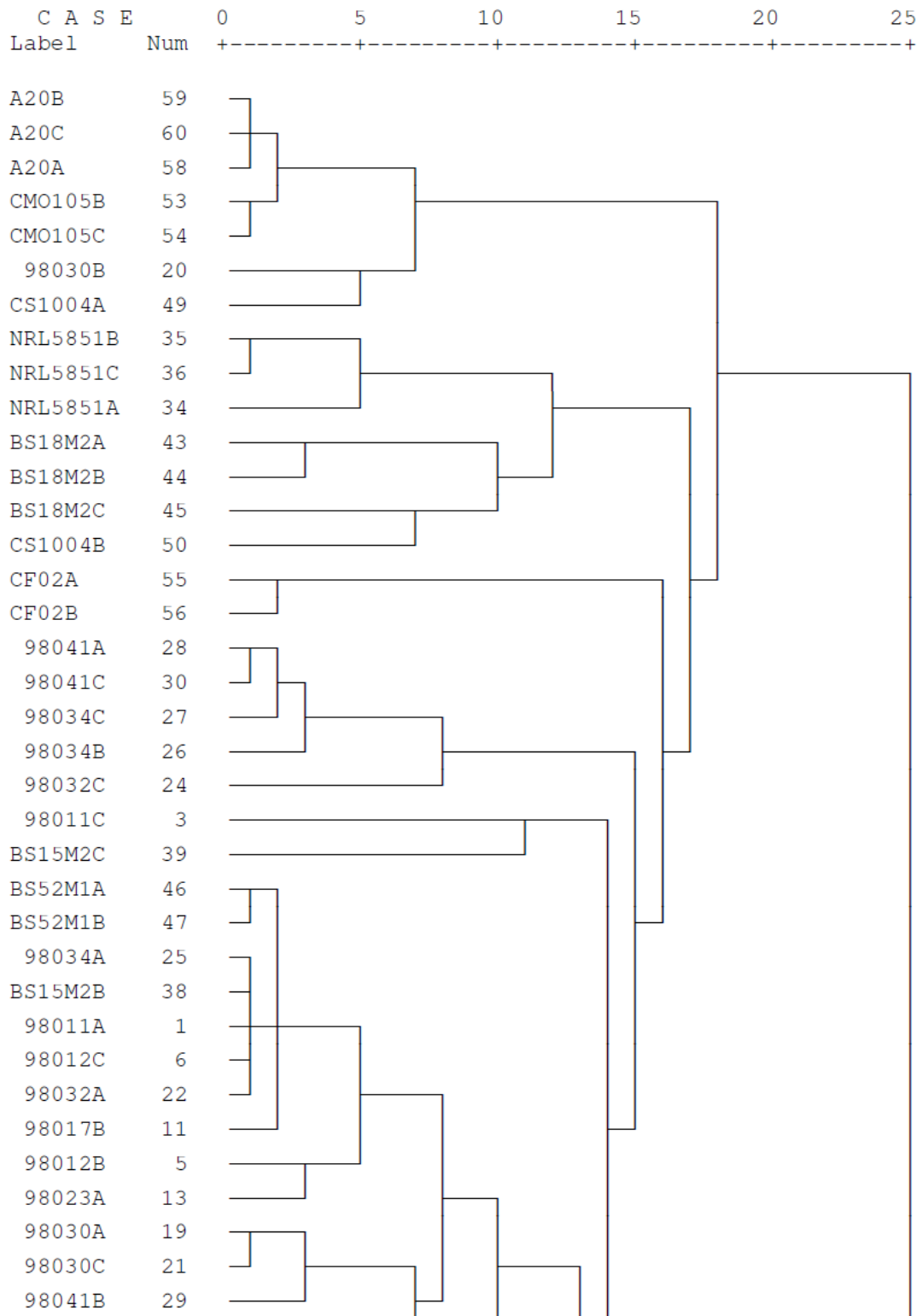
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-4R com isolados do Brasil e outros Países.



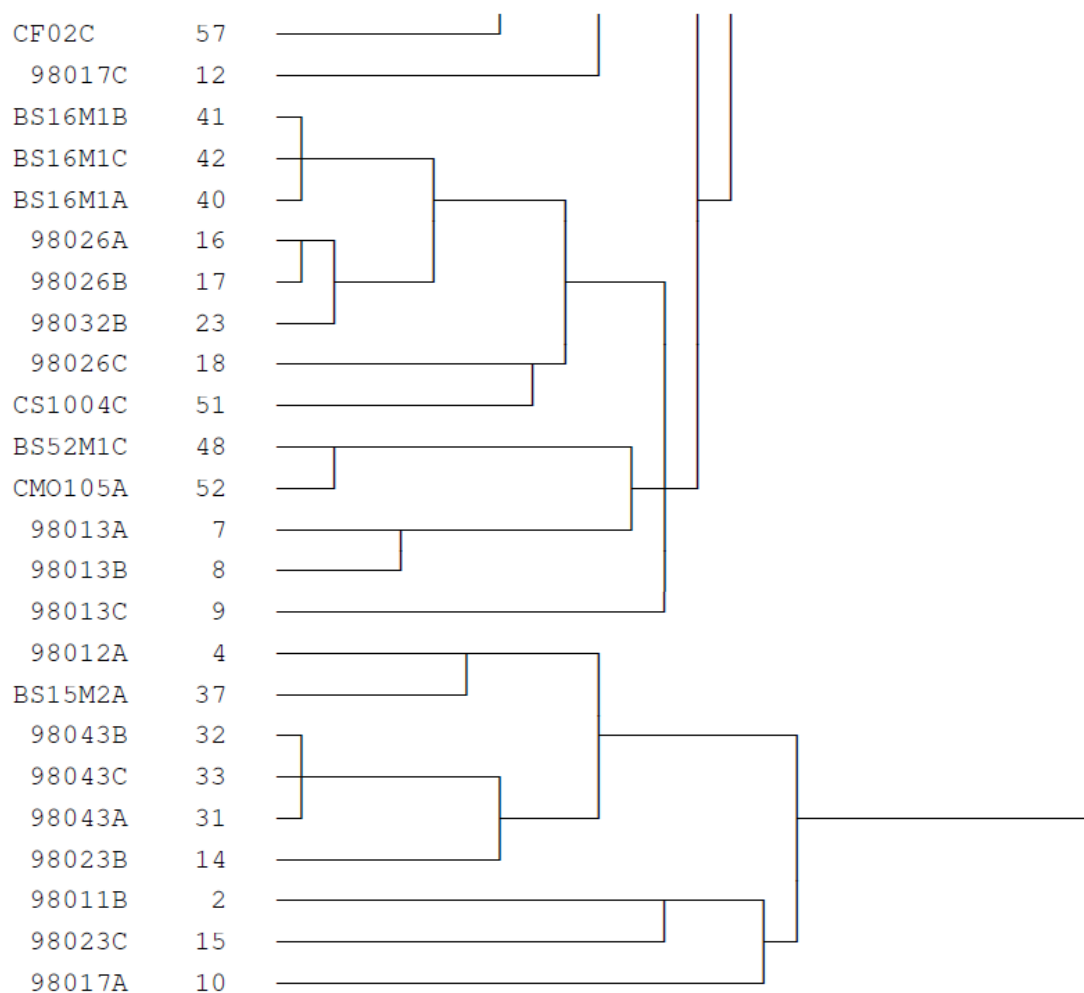
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-4R com isolados do Brasil e outros Países.



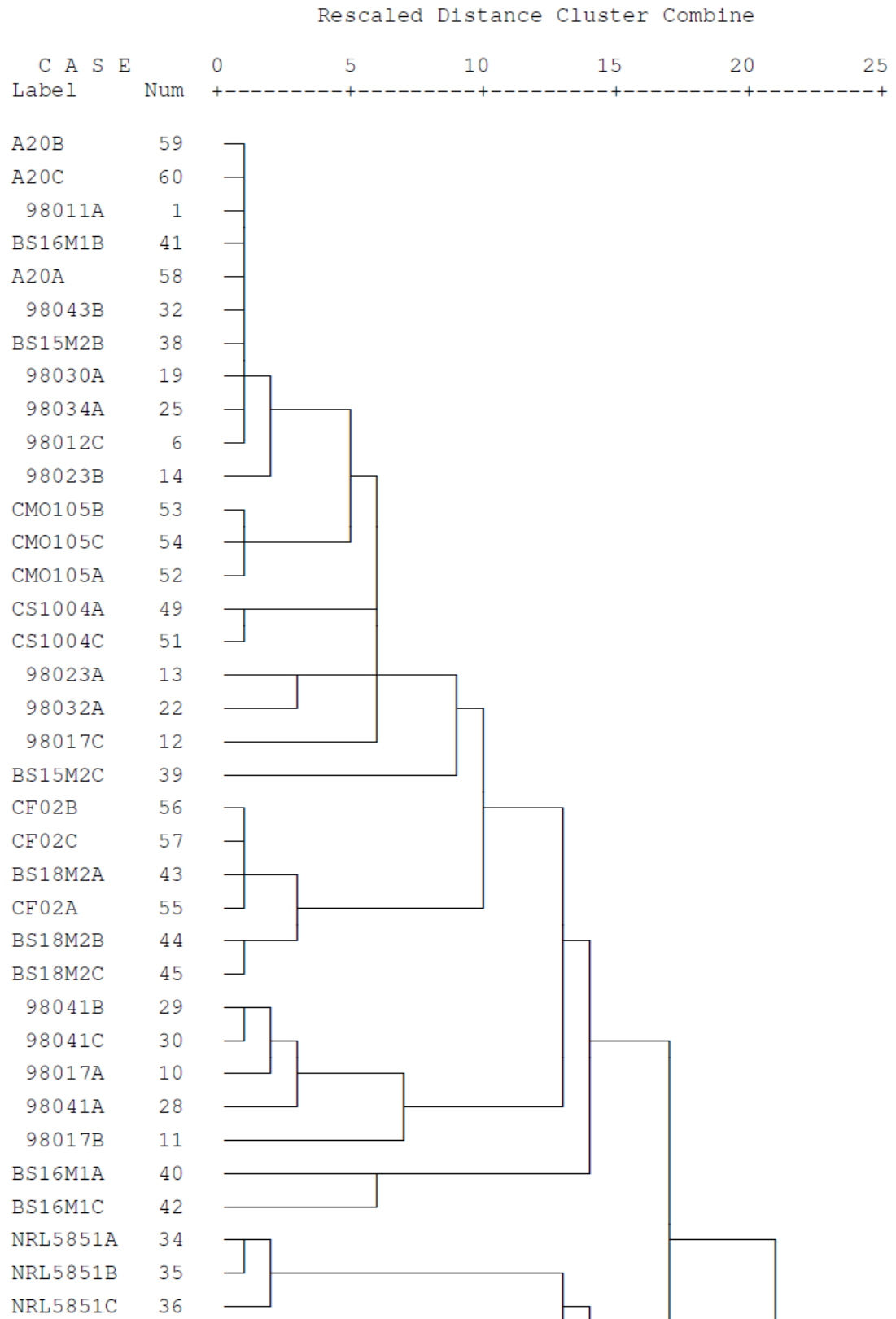
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-6R com isolados do Brasil e outros Países.



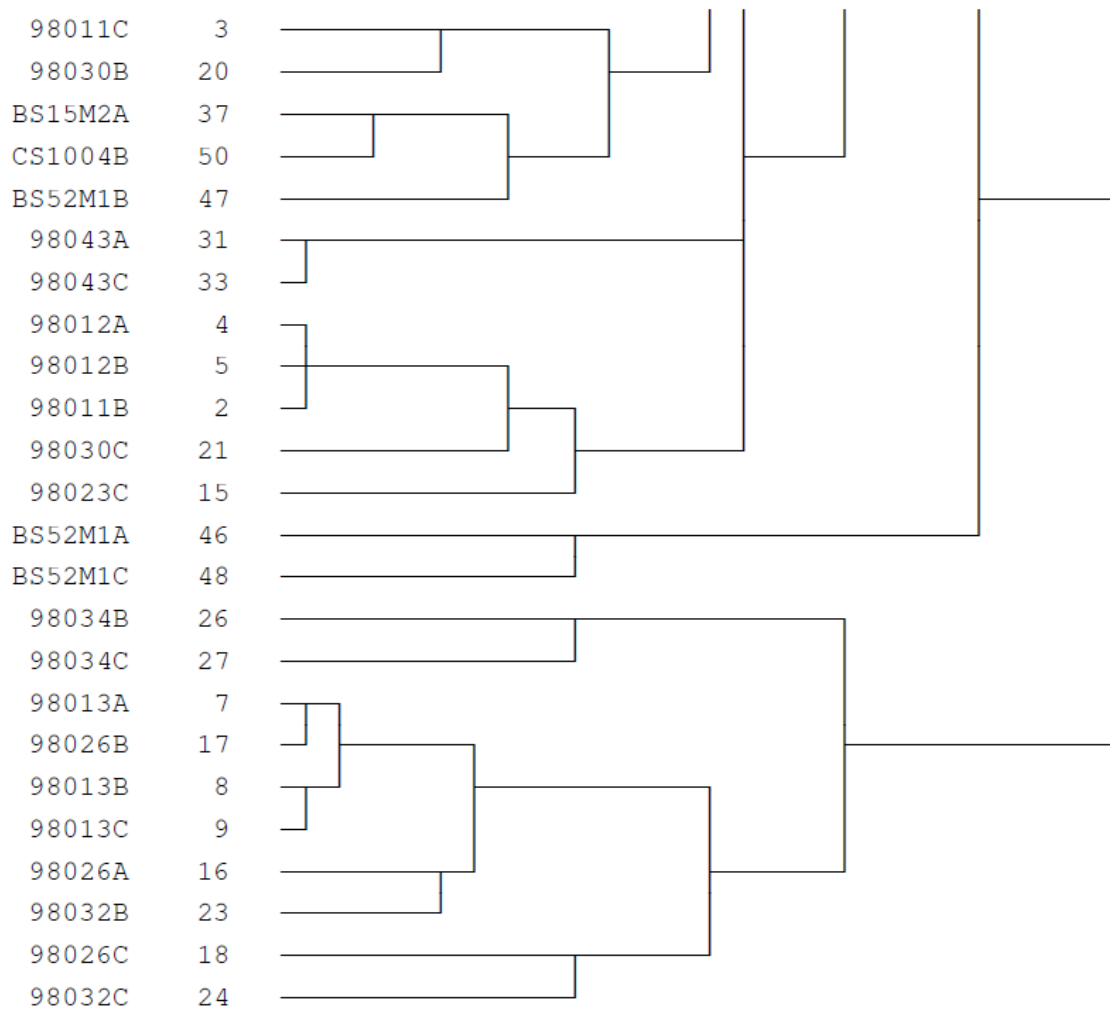
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-6R com isolados do Brasil e outros Países.



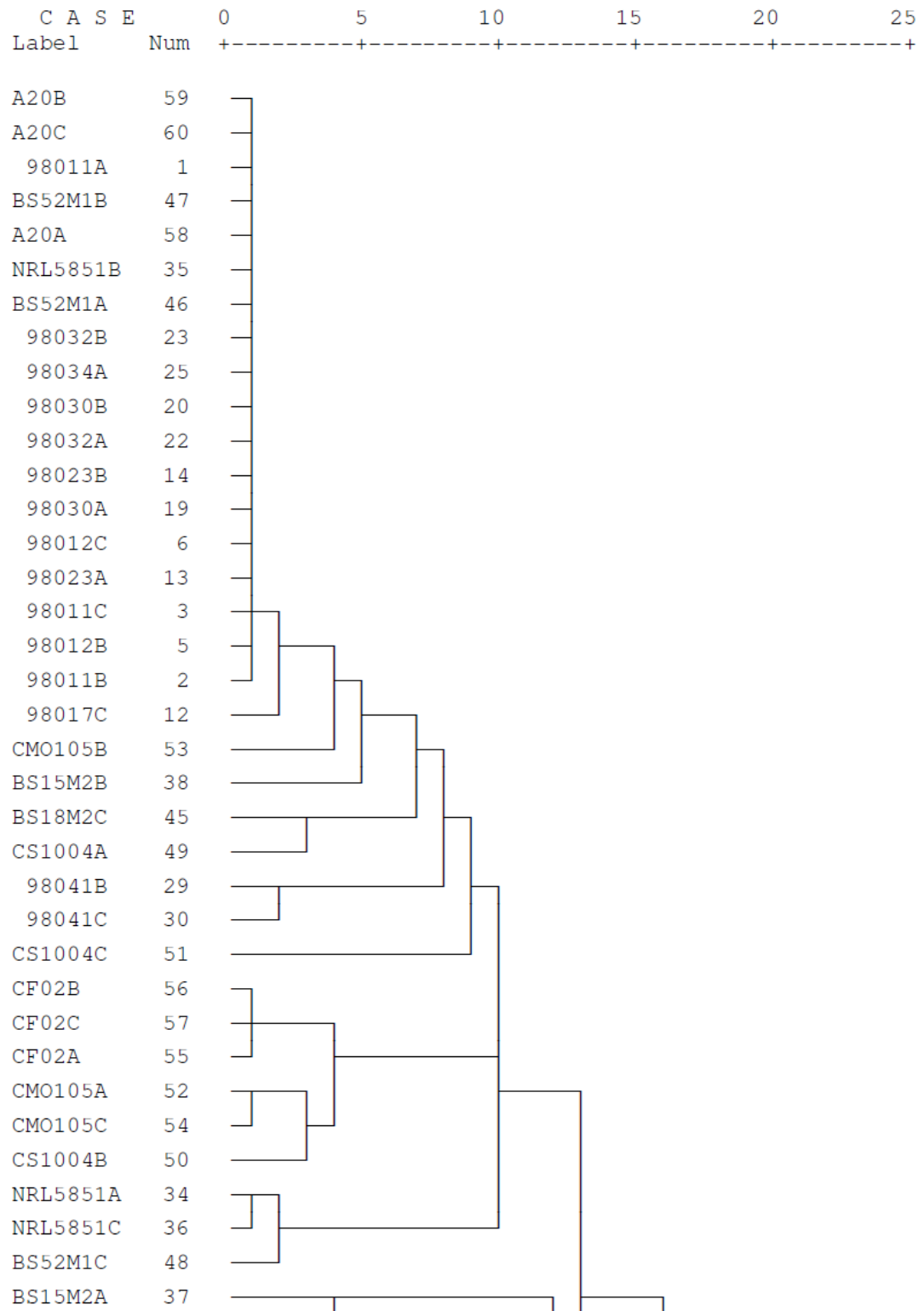
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-9F com isolados do Brasil e outros Países.



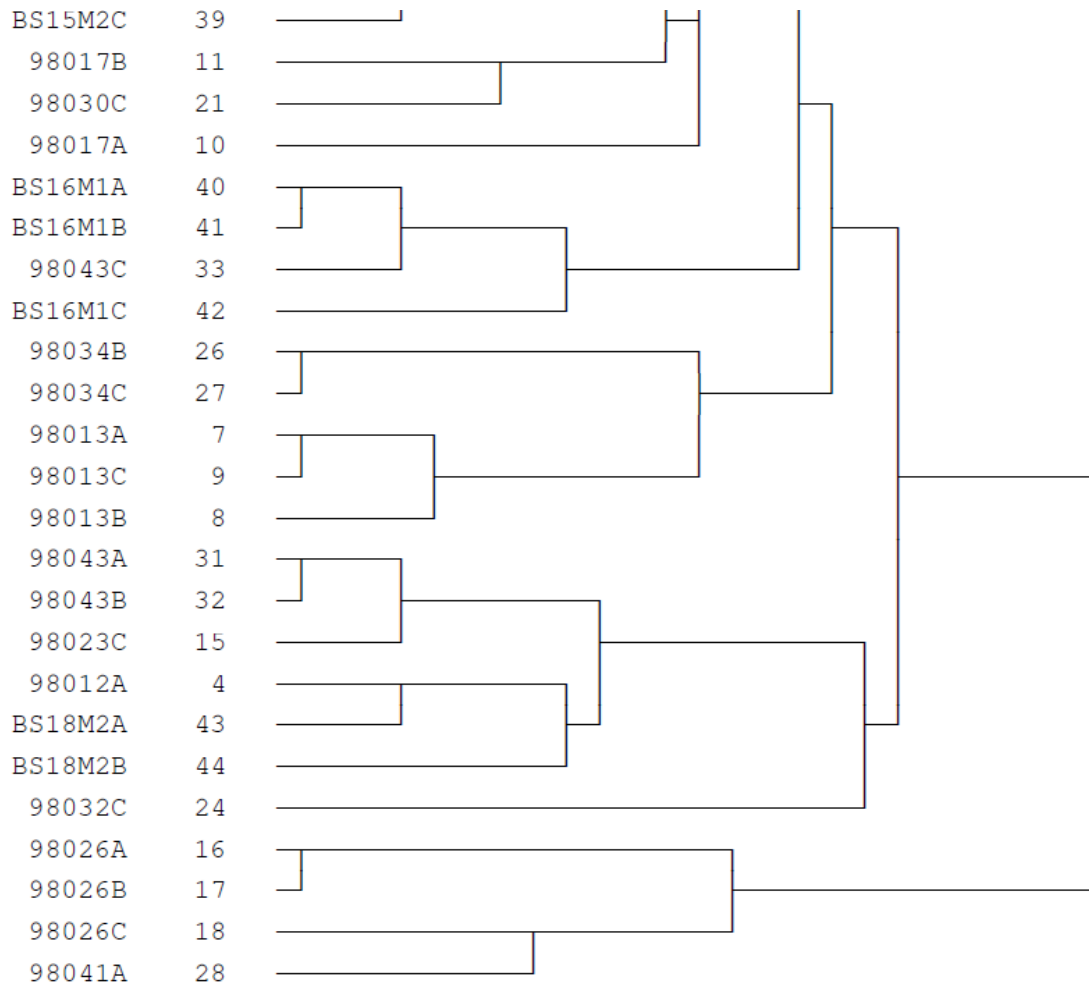
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-9F com isolados do Brasil e outros Países.



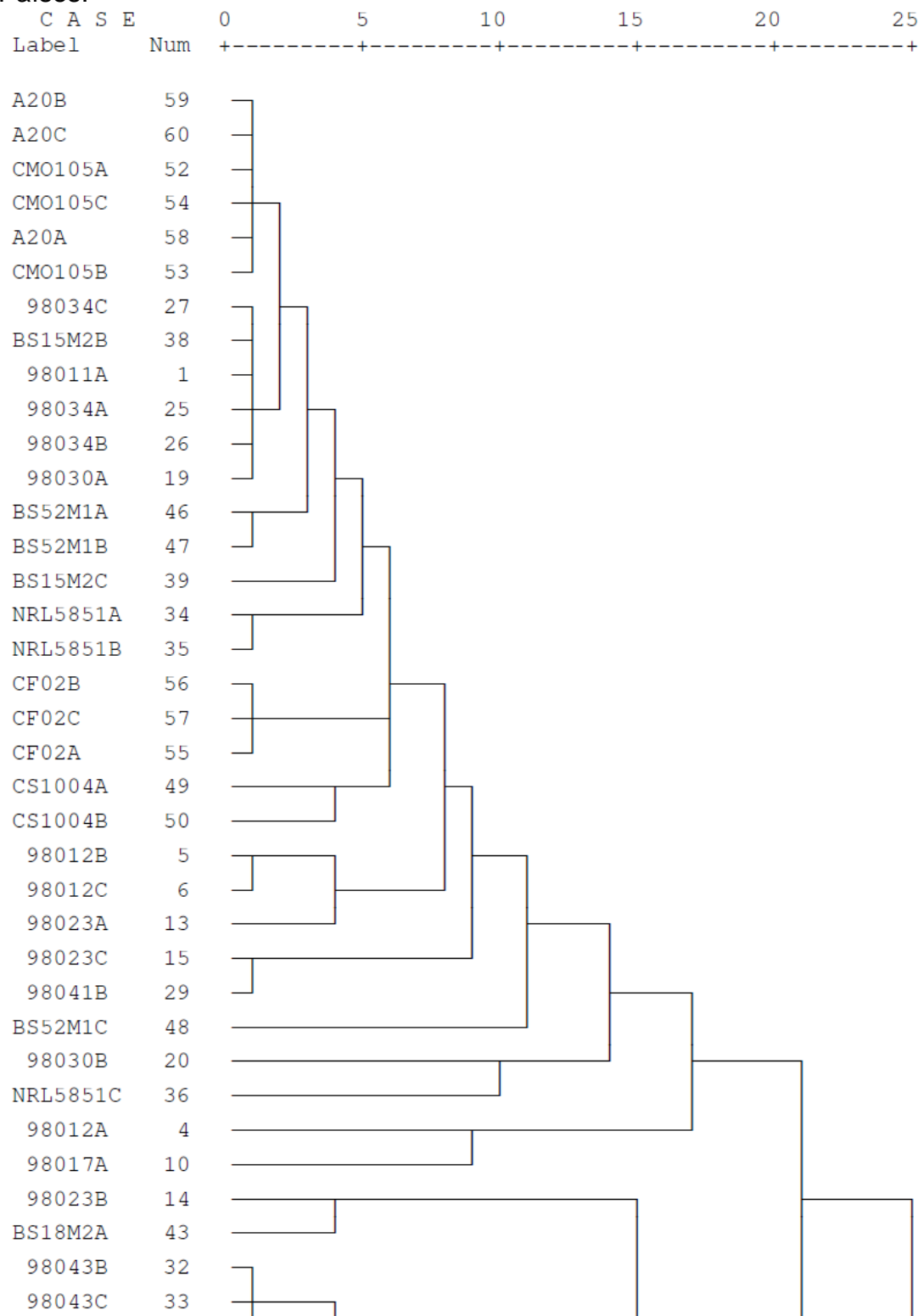
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-13R com isolados do Brasil e outros Países.



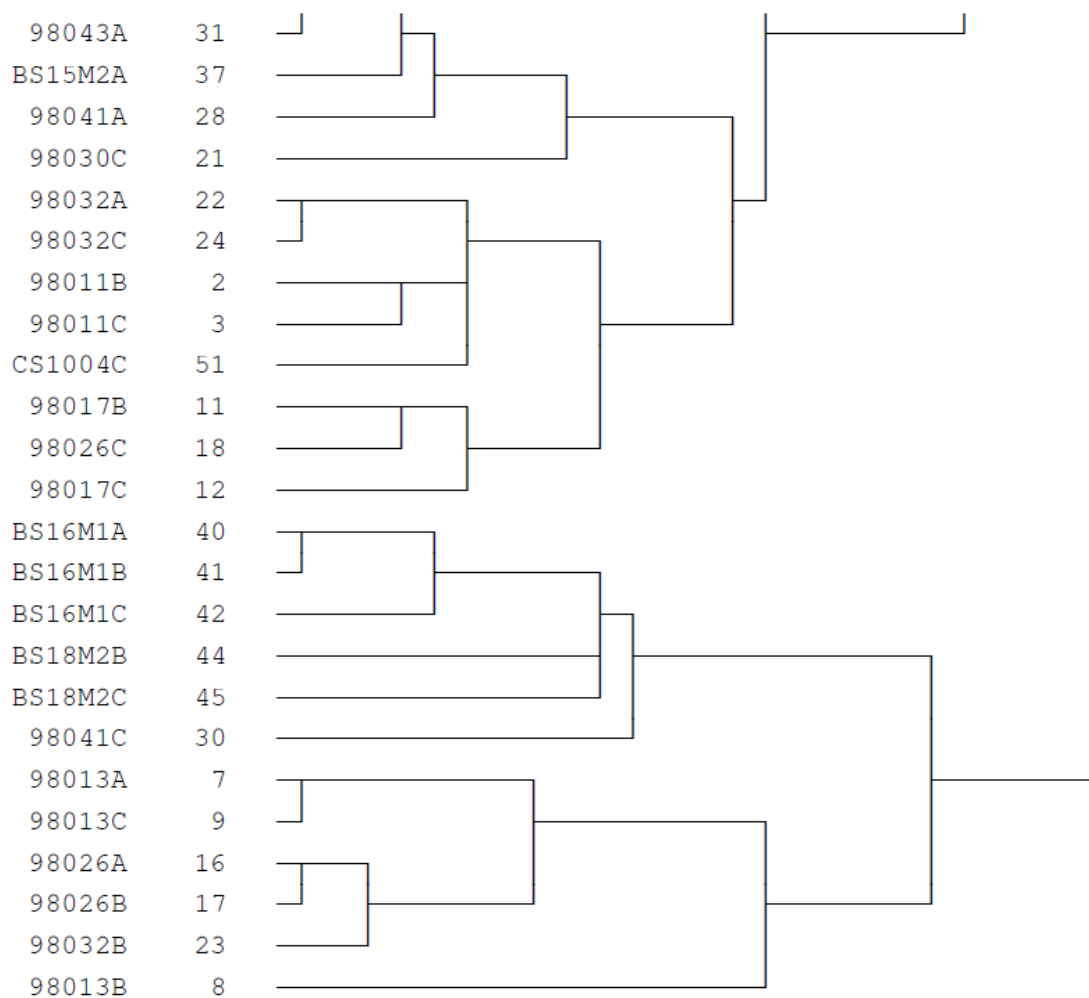
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-13R com isolados do Brasil e outros Países.



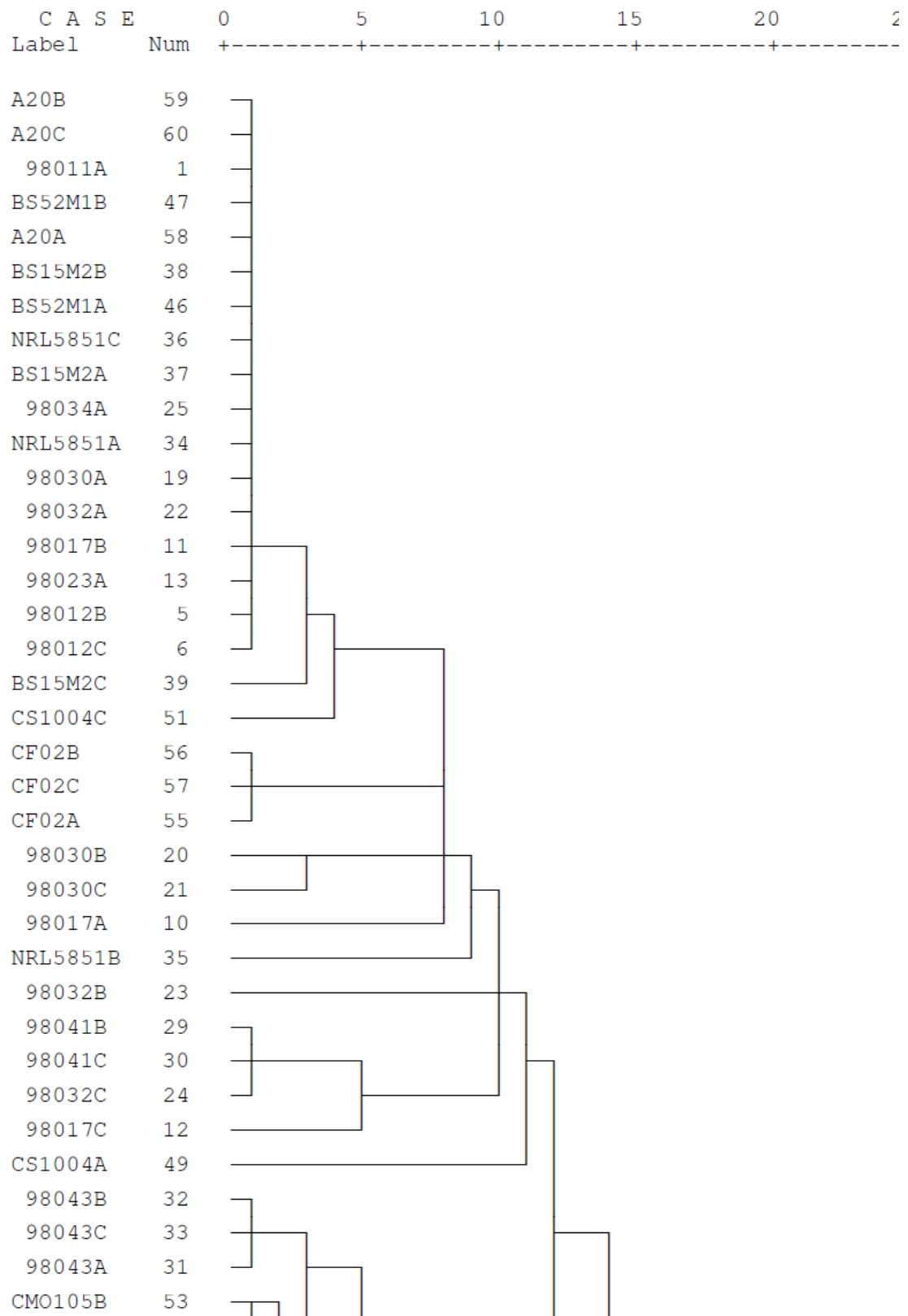
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-17R com isolados do Brasil e outros Países.



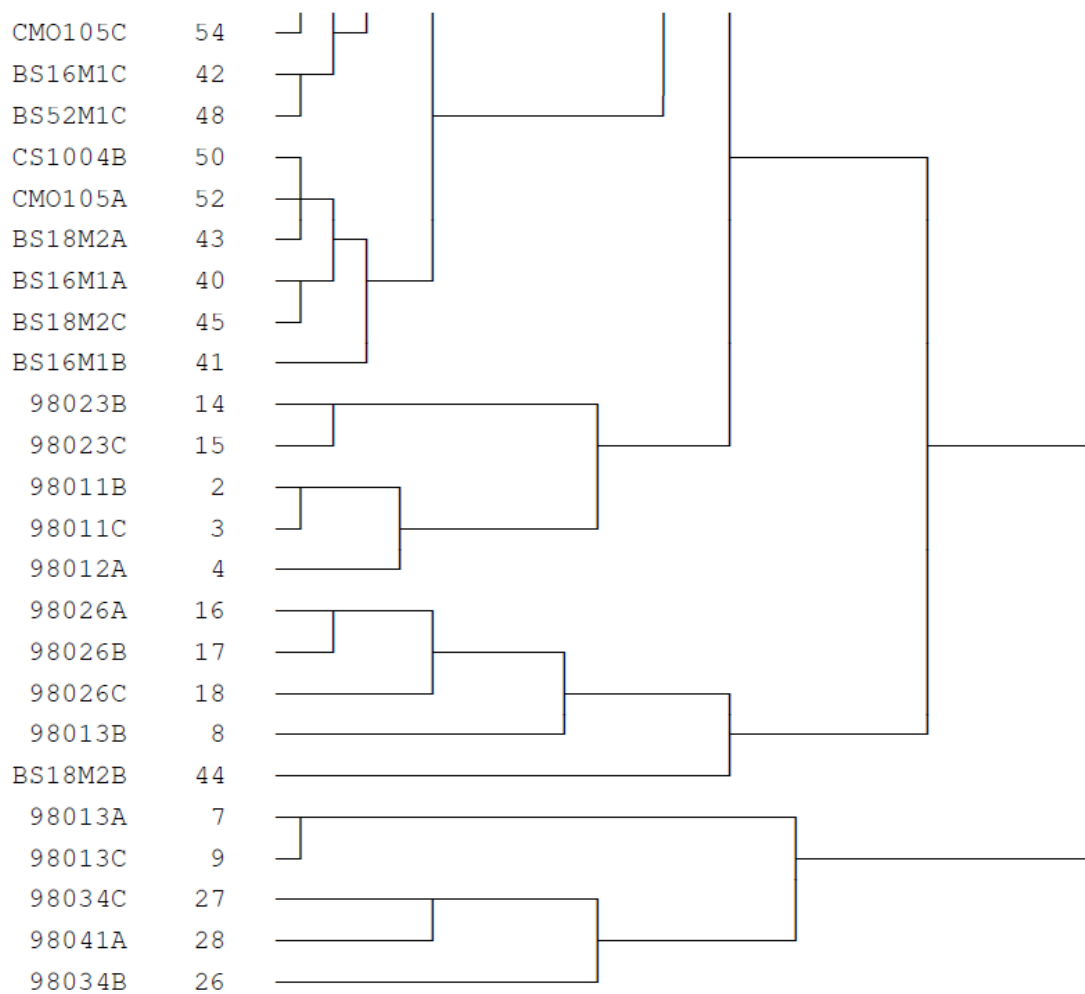
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-17R com isolados do Brasil e outros Países.



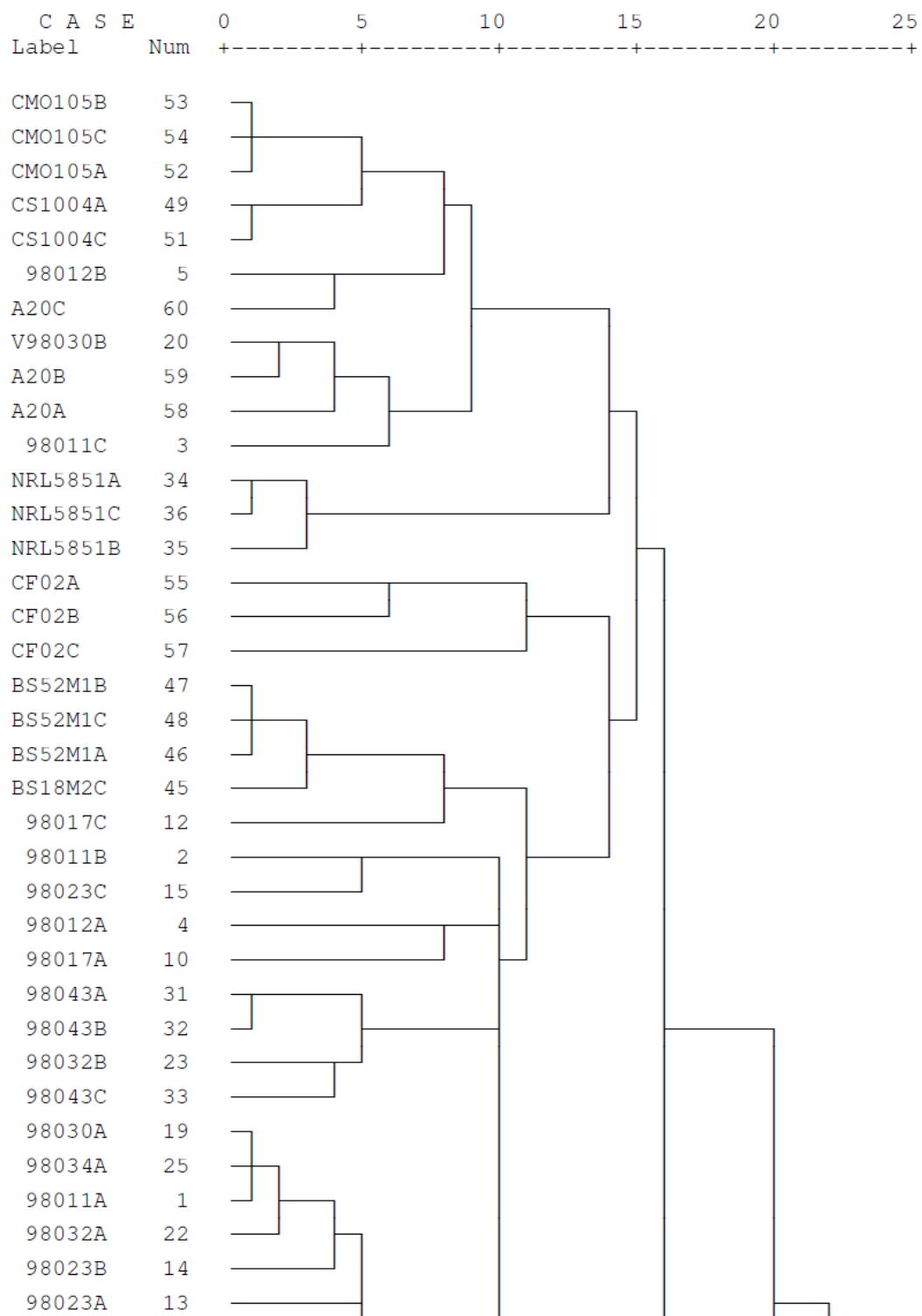
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-25F com isolados do Brasil e outros Países.



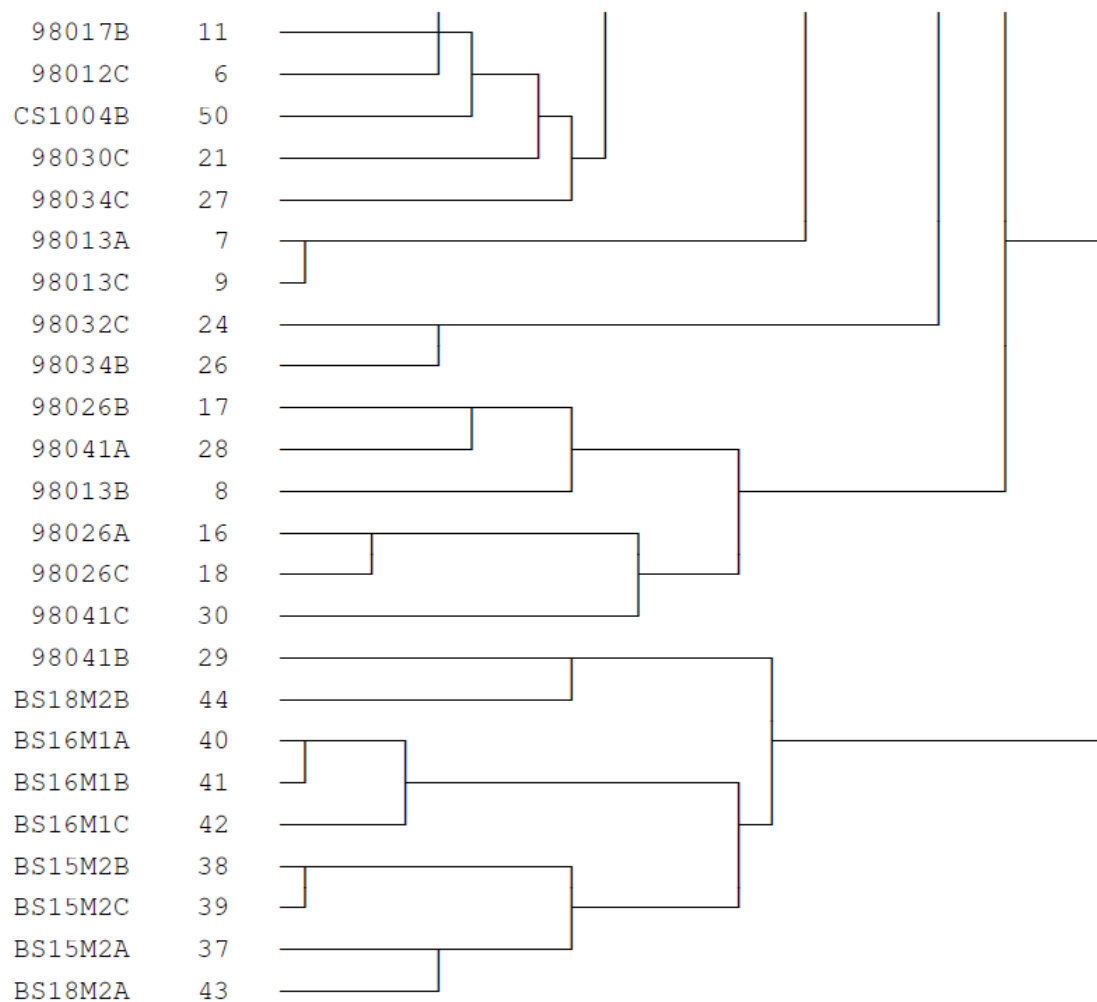
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-25F com isolados do Brasil e outros países.



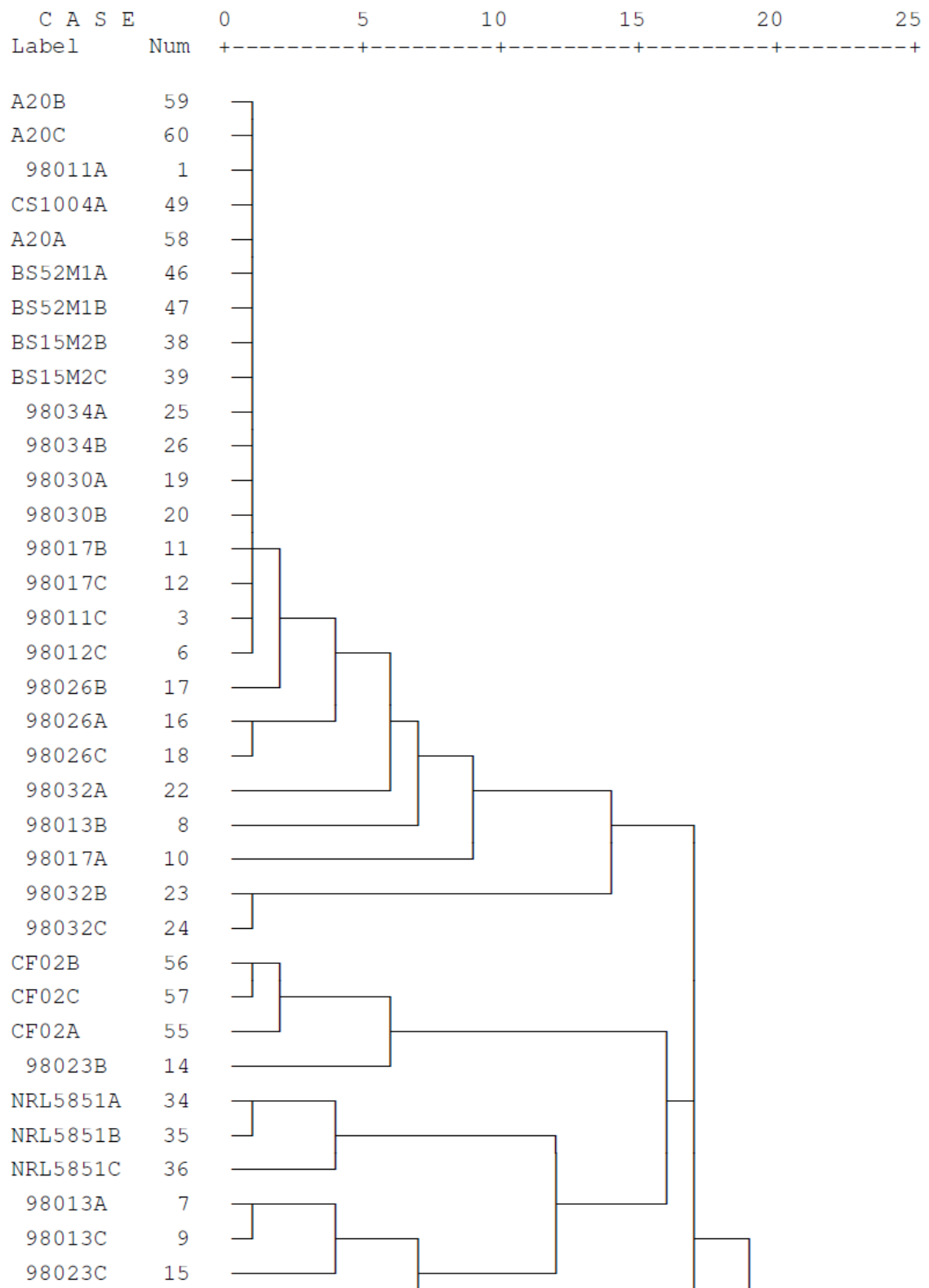
Dendrograma do oligonucleotídeo URP-30F com isolados do Brasil e outros Países.



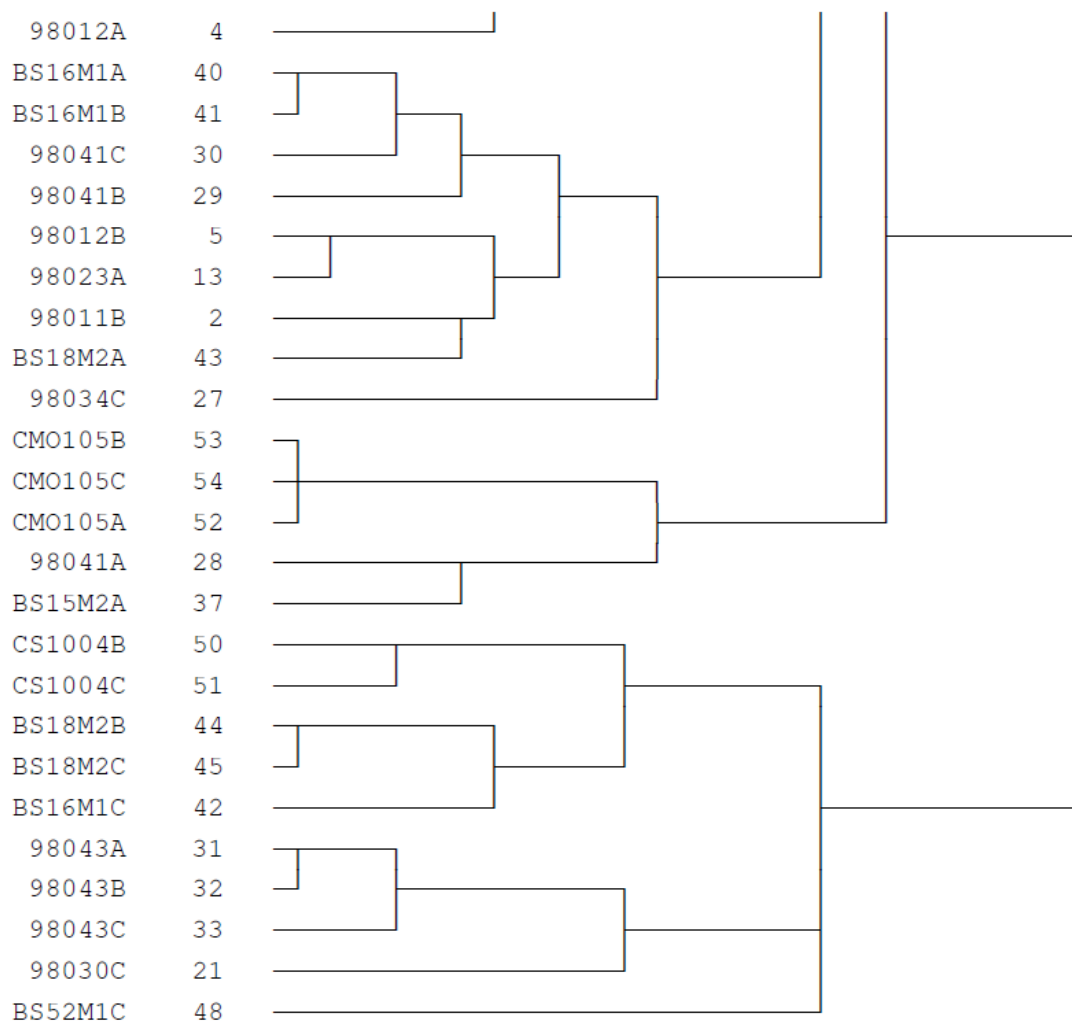
(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-30F com isolados do Brasil e outros Países.



Dendrograma do oligonucleotídeo URP-32F com isolados do Brasil e outros Países.

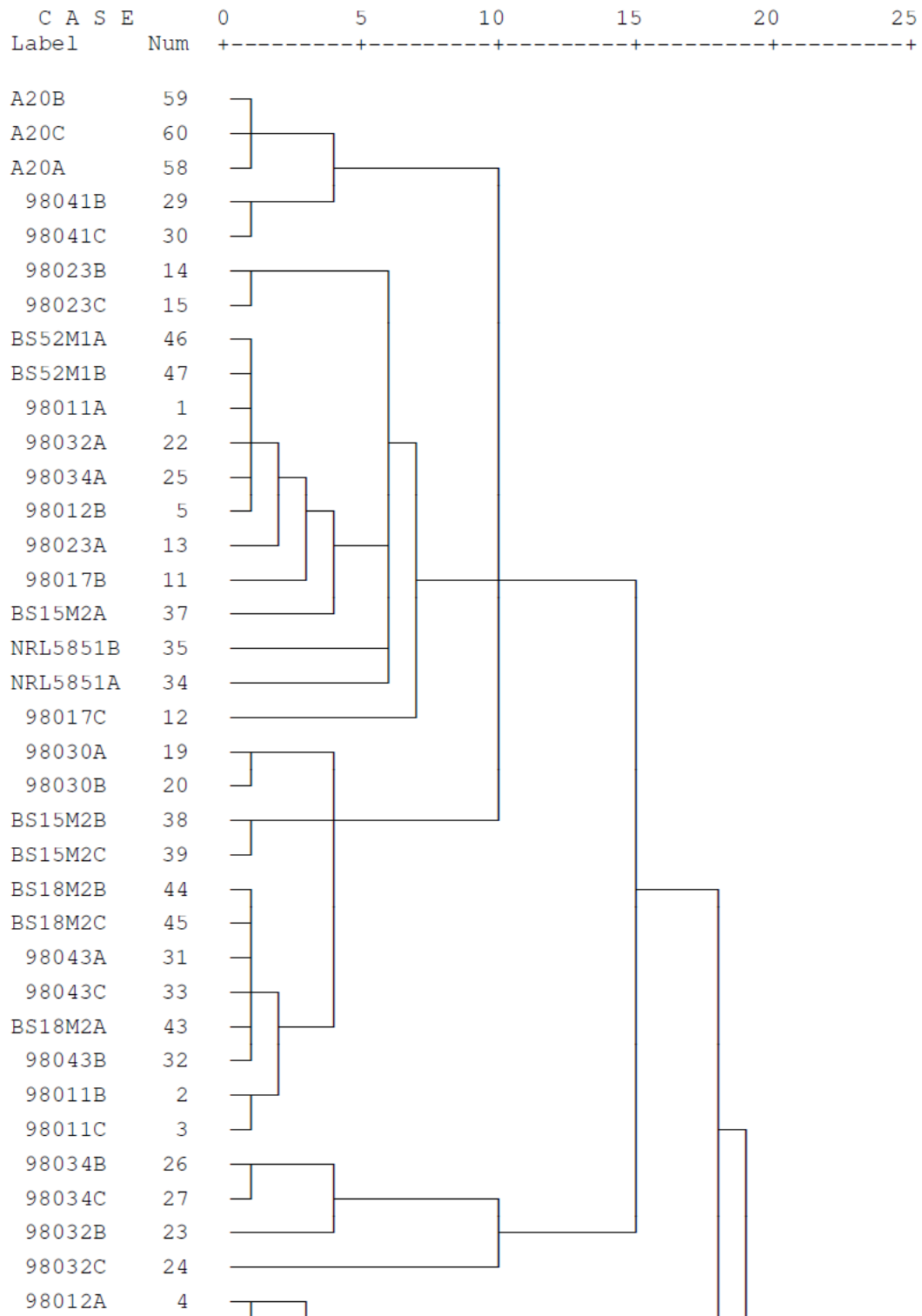


(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-32F com isolados do Brasil e outros Países.

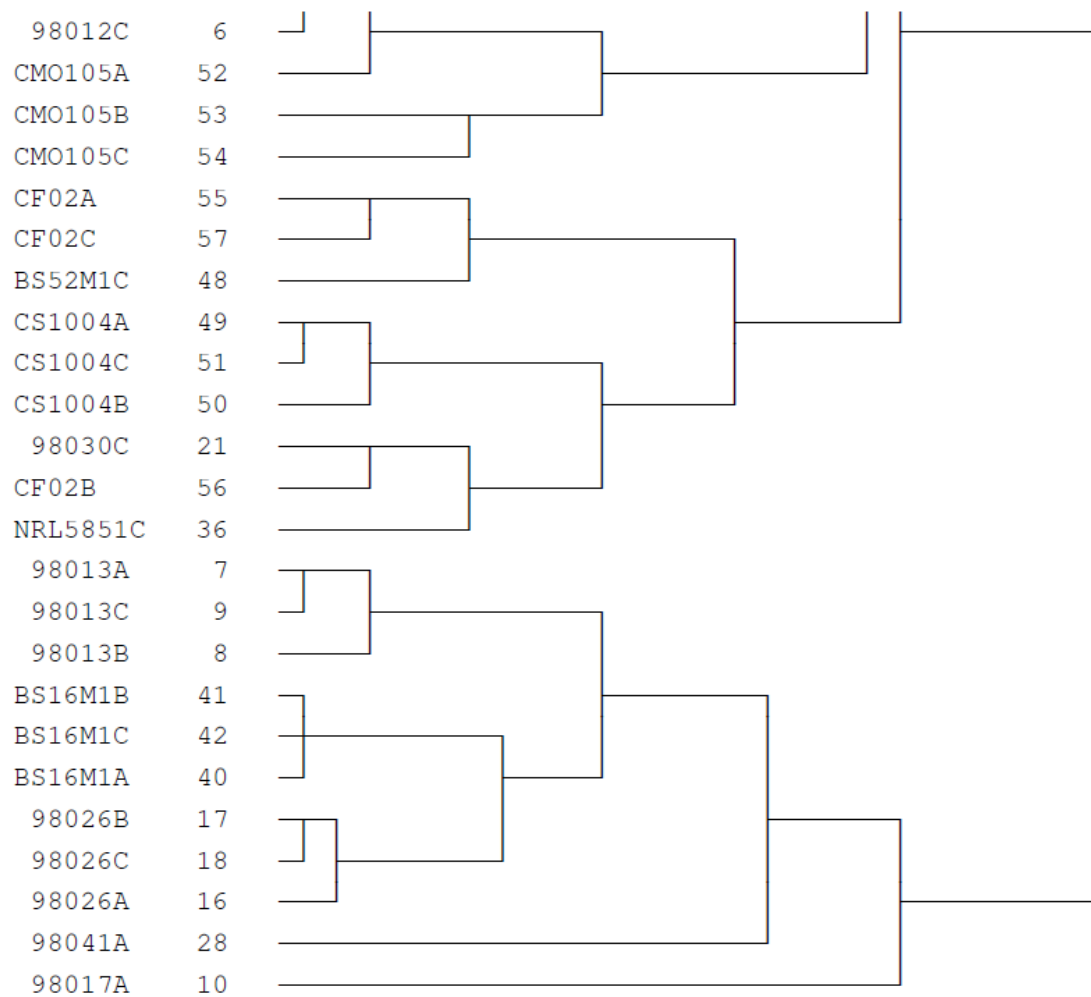


Dendrograma do oligonucleotídeo URP-38F com isolados do Brasil e outros

Países.



(Continuação) Dendrograma do oligonucleotídeo URP-38F com isolados do Brasil e outros Países.



9. VITA

9.1 Dados Pessoais

Nome: Michele Bertoni Mann

Nascimento: 17.10.1976, Porto Alegre / RS – Brasil

Filiação: Ironi Pinto Bertoni e Alvo Ivo Mann

E-mail: michelemann@hotmail.com

9.2 Formação acadêmica

2001-2007 Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Luterana do Brasil, Canoas, Brasil.

Orientador (a): Itálo Abrantes Sampaio

2000-2001 Escola Técnica Estadual Irmão Pedro

Curso Técnico em secretariado de Nível Médio, Porto Alegre/ Brasil

1994-1996 Ensino Médio (2^o Grau)

Escola Estadual de 1^o e 2^o Graus Monsenhor Queiróz, Pelotas/
Brasil

1986 –1994 Ensino Fundamental (1^o Grau)

Escola Estadual de 1^o e 2^o Graus Dom João Braga, Pelotas/Brasil

9.3 Experiência Profissional

2006 -2007 Iniciação Científica

Título: Produção, purificação e caracterização de compostos
Bioativos de *Streptomyces* sp.

Orientador: Dr. Sueli T. Van Der Sand

2006 – 2007 Estágio Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Serviço de Hemoterapia – setor de Criobiologia e técnicas especiais.

2002- 2004 Iniciação Científica
Laboratório de Extensão – UFRGS
Orientador: Dr. Gertrudes Corção