

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

Heloísa Giacomelli Ribeiro

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E
DESENVOLVIMENTO DE *PRIMER* ESPECÍFICO PARA IDENTIFICAÇÃO
MOLECULAR DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Bipolaris sorokiniana***

Porto Alegre

2019

Heloísa Giacomelli Ribeiro

**IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E
DESENVOLVIMENTO DE *PRIMER* ESPECÍFICO PARA IDENTIFICAÇÃO
MOLECULAR DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Bipolaris sorokiniana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof^(a). Dr. Sueli
Teresinha Van Der Sand

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

Ribeiro , Heloísa Giacomelli
Identificação morfológica de fungos fitopatogênicos
e desenvolvimento de primer específico para
identificação molecular do fungo fitopatogênico
Bipolaris sorokiniana / Heloísa Giacomelli Ribeiro .
-- 2019.
86 f.
Orientadora: Sueli Teresinha Van Der Sand.

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, 2019.

1. Fungos fitopatogênicos . 2. Identificação
morfológica. 3. Identificação molecular. 4. Universal
Rice Primers . 5. Bipolaris sorokiniana . I. Van Der
Sand, Sueli Teresinha, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

“Quando a vida decepciona qual é a solução? Continue a nadar, continue a nadar...”

Dory

AGRADECIMENTOS

À minha família e aos meus amigos que me acompanharam durante essa jornada, obrigada! Só tenho de agradecer o apoio, compreensão e incentivo de todos.

Às minhas colegas de trabalho Marcela Proença Borba, Ana Elisa Ballarini, Gabriele Zvir Saldanha, Roberta Taufer Boff e Raíssa Nunes que tanto me ensinaram e me ajudaram e aos estagiários Tom Nunes e Dheidry Lampert que contribuíram para a execução deste trabalho.

À professora Sueli Teresinha Van der Sand que me orientou intelectualmente e espiritualmente para que eu pudesse compreender e crescer com tudo que eu aprendi.

A todos os professores e técnicos do programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente que contribuíram com seus ensinamentos no meu processo de aprendizagem.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, por oportunizar o desenvolvimento deste trabalho, à Embrapa e a UFPel pela colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Por fim, à minha vó, Geni Andrade da Silva Giacomelli, que não teve oportunidade de ir à escola, mas mesmo assim me ensinou que “sem estudo a gente não é nada” como ela sempre dizia.

IDENTIFICAÇÃO MORFOLÓGICA DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS E DESENVOLVIMENTO DE *PRIMER* ESPECÍFICO PARA IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DO FUNGO FITOPATOGÊNICO *Bipolaris sorokiniana*¹

Autora: Heloísa Giacomelli Ribeiro

Orientadora: Prof^(a). Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

RESUMO

Bipolaris sorokiniana é um fungo fitopatogênico que ataca diversas gramíneas causando doenças principalmente na cultura de trigo. O diagnóstico das doenças causadas por fungos fitopatogênicos geralmente envolve apenas a identificação morfológica destes microrganismos o que requer tempo e mão de obra especializada. Desta forma, a aplicação de ferramentas de biologia molecular que viabilizem um rápido e preciso diagnóstico deste fungo é importante. Este trabalho teve como objetivo buscar uma região no cromossoma de *Bipolaris sorokiniana* para utilizá-la como referência para o desenho de *primers* específicos. Para tanto foram realizados ensaios de reações em cadeia da polimerase com dois *primers* universais do genoma de arroz (URP- *Universal Rice Primers*), URP 6R e URP 38F, com o objetivo de identificar fragmentos de DNA monomórficos para *Bipolaris sorokiniana*. Com base nas sequências de um fragmento monomórfico gerado com o *primer* URP 6R e de um fragmento monomórfico gerado com o *primer* URP 38F foram desenhados três pares de *primers*. Um par foi considerado inespecífico para o fungo *Bipolaris sorokiniana* enquanto dois pares foram considerados específicos para isolados do gênero e espécie *Bipolaris sorokiniana* e têm potencial para serem utilizados na identificação e detecção deste fungo.

¹Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (86 p.) Março, 2019.

MORPHOLOGICAL IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGUS AND DEVELOPMENT OF SPECIFIC PRIMER FOR MOLECULAR IDENTIFICATION OF PHYTOPATHOGENIC FUNGUS *Bipolaris sorokiniana*¹

Author: Heloísa Giacomelli Ribeiro

Advisor: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van der Sand

ABSTRACT

Bipolaris sorokiniana is a phytopathogenic fungus that attacks several grasses causing diseases mostly in wheat crop. Diagnosis for diseases caused by phytopathogenic fungi generally involves the morphological identification only of these microorganisms, which requires time and specialized manpower. Thus, the application of molecular biology tools that allow a quick and accurate diagnosis of this fungus is important. The objective of this work was to search for a region in *Bipolaris sorokiniana* chromosome that could be used to design specific primers. Therefore, polymerase chain reaction assays were performed with two Universal Rice Primers, URP 6R and URP 38F, with the objective of identify *Bipolaris sorokiniana* monomorphic DNA fragments. Based on the sequences of the monomorphic fragments three pairs of primers were designed. One pair was considered non-specific for *Bipolaris sorokiniana* while two pairs were considered specific for the genus and *Bipolaris sorokiniana* species and have the potential to be used in the identification and detection of this fungus.

¹Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (pp.86) march, 2019.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos Específicos	3
3.	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	A cultura do trigo	4
3.2	Fungos fitopatogênicos	5
3.3	Doenças fúngicas do trigo	8
3.4	Técnicas moleculares para a identificação de fungos	14
4.	MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1	Obtenção dos isolados	18
4.2	Identificação morfológica.....	20
4.2.1	Crescimento em meio de cultivo.....	21
4.2.2	Microcultivo.....	21
4.3	Extração de DNA genômico	21
4.3.1	Cultivo dos isolados fúngicos em meio líquido	21
4.3.2	Extração de DNA genômico dos isolados fúngicos	22
4.3.3	Assepsia das sementes de trigo.....	22
4.3.4	Extração de DNA genômico de trigo	23
4.3.5	Análise da qualidade e quantificação do DNA.....	23
4.4	Identificação genotípica.....	24
4.4.1	ITS-PCR.....	24
4.4.2	Eletroforese em gel de agarose.....	24
4.4.3	Análise das sequências.....	24
4.5	Desenvolvimento de metodologia de identificação molecular	25
4.5.1	URP-PCR.....	25
4.5.2	Eletroforese em gel de agarose.....	27
4.6	Desenvolvimento de <i>primers</i> específicos para <i>B. sorokiniana</i>	26
4.6.1	Purificação dos fragmentos monomórficos.....	26
4.6.2	Preparação das células competentes com cloreto de cálcio (CaCl ₂)	26
4.6.3	Reação de clonagem.....	27

4.6.4	Transformação por choque térmico	28
4.6.5	Extração de DNA plasmidial de bactérias transformadas	28
4.6.5.1	Preparação de células.....	28
4.6.5.2	Extração de DNA plasmidial	28
4.6.6	Digestão com endonuclease de restrição	29
4.6.7	M13-PCR.....	29
4.7	Desenho de <i>primers</i> específicos.....	30
4.8	PCR com <i>primers</i> específicos.....	30
4.8.1	<i>Primers</i> 6R 127F-547R – PCR	30
4.8.2	<i>Primers</i> 38F 189F-648R – PCR	30
4.8.3	Eletroforese em gel de agarose	31
5.	RESULTADOS	32
5.1	Identificação morfológica	32
5.2	Identificação genotípica	42
5.3	Amplificação utilizando <i>primers</i> URP	49
5.3.1	Perfil de amplificação com <i>primer</i> URP 6R.....	49
5.3.2	Perfil de amplificação com <i>primer</i> URP 38F	50
5.4	Obtenção das sequências para desenho dos <i>primers</i> específicos.....	51
5.5	Amplificação com <i>primers</i> específicos	57
6.	DISCUSSÃO.....	60
7.	CONCLUSÕES.....	68
8.	REFERÊNCIAS	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais fungos das sementes de trigo.....	8
Tabela 2.	Técnicas moleculares baseadas em PCR que são utilizadas na identificação de fungos fitopatogênicos.....	14
Tabela 3.	Isolados fúngicos e sua origem.....	18
Tabela 4.	Sequência de <i>primers</i> ITS.....	24
Tabela 5.	Sequências de <i>primers</i> URP.....	25
Tabela 6.	Sequência de <i>primers</i> M13.....	30
Tabela 7.	Identificação morfológica e genotípica dos isolados fúngicos fitopatogênicos.....	44
Tabela 8.	Sequências dos <i>primers</i> desenhados para <i>B. sorokiniana</i>	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	A pirâmide alimentar do brasileiro.....	4
Figura 2.	Colônia micelial e conídios do fungo filamentoso <i>Bipolaris sorokiniana</i>	7
Figura 3.	Conidióforos e conidiósporos do fungo fitopatogênico <i>Bipolaris sorokiniana</i>	11
Figura 4.	Podridão comum das raízes.....	12
Figura 5.	Helminthosporiose.....	13
Figura 6.	Mapa do vetor pCR [®] 2.1-TOPO [®]	27
Figura 7.	Características das colônias miceliais e dos conídios de isolados de <i>Alternaria</i>	33
Figura 8.	Característica da colônia micelial e conídios do isolado LMA323AL_5.....	34
Figura 9.	Característica das colônias miceliais e conídios de isolados de <i>Drechslera</i>	35
Figura 10.	Comparação do crescimento fúngico em meio BDA (esquerda) e o meio CA (direita).....	36
Figura 11.	Característica das colônias miceliais e conídios de isolados de <i>Aspergillus</i> , <i>Exserohilum</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Gerlachia</i> , <i>Paecilomyces</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Rhizopus</i> e <i>Ulocladium</i>	38
Figura 12.	Característica das colônias miceliais e conídios de isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	41
Figura 13.	Amplificação com <i>primer</i> URP 6R de DNA de isolados fúngicos e DNA de trigo.....	49
Figura 14.	Amplificação com <i>primer</i> URP 38F de DNA de isolados fúngicos e DNA de trigo.....	50
Figura 15.	Sequência da amostra 6R1.....	53
Figura 16.	Sequência da amostra 6R4.....	54
Figura 17.	Sequência da amostra 6R5.....	55
Figura 18.	Sequência da amostra 38F2.....	56
Figura 19.	Amplificações com <i>primers</i> 6R 127F–547R.....	57
Figura 20.	Amplificações com <i>primers</i> 38F 189F–648R.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ONU	Organização das Nações Unidas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
URP	<i>Universal Rice Primers</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAO	Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
IPCC	<i>International Plant Protection Convention</i>
CNTP	Centro Nacional de Pesquisa do Trigo
BDA	Ágar Batata Dextrose
ITS	Região dos espaçadores internos transcritos
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
CIMYTT	<i>International Maize and Wheat Improvement Center</i>
V8 – BDA	V8 Ágar Batata Dextrose
CA	Ágar Cenoura
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
LB	Luria – Bertani

1. INTRODUÇÃO

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma das primeiras espécies de gramíneas domesticadas pelo homem. Este cereal é fundamental para a base alimentar da humanidade sendo o segundo alimento mais consumido no mundo e o seu plantio em sistemas de rotação de culturas é essencial para a sustentabilidade da economia brasileira (MANAMGODA et al., 2014; PIRES, 2017; RESENDE; VEKIC, 2018).

Em 2016 a cadeia produtiva do trigo gerou um volume de renda de R\$ 25,3 bilhões para o Brasil e a produção deste cereal para a safra de 2018/2019 está estimada em 5.239 mil toneladas, 22,9% maior que a safra 2017/2018. Embora o Brasil seja um importante produtor de trigo, a metade deste cereal que é utilizado na indústria é oriundo de importação, principalmente da Argentina. Entretanto, nas previsões das safras de 2018/2019 a Rússia consolida-se como o principal fornecedor mundial, exportando para o Brasil um total de 26,22 mil toneladas (ABITRIGO, 2018a, 2018b).

Assim como o clima úmido da região sul do Brasil permite a plantação do trigo durante o ano inteiro ele propicia o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (FERNANDES; PICININI, 1999; PIRES, 2017). A contaminação do trigo por fungos pode resultar na redução da produtividade nas lavouras, a doenças em humanos e animais e à rejeição do produto, tanto no mercado interno quanto no mercado externo (BERNARDI et al., 2018).

Bipolaris sorokiniana é uma espécie de fungo fitopatogênico que pode estar relacionado a doenças comumente detectadas em plantações, tais como manchas foliares, podridão das raízes e podridão do pé (BACALTCHUK et al., 2006; MANAMGODA et al., 2014). Este fungo pode infectar todos os órgãos do trigo e quando acomete as sementes causa a doença denominada mancha marrom ou helmintosporiose, que pode causar perdas de até 80% (KIMATI et al., 1997).

O ano de 2020 foi declarado pela Organização das Nações Unidas (ONU) como Ano Internacional da Defesa Fitossanitária. A disseminação dos patógenos ao redor do mundo é um fator preocupante e uma correta identificação é necessária para o tratamento adequado das doenças (BENEVIDES; MARINHO, 2015; FAO; IPPC, 2018; RESENDE; VEKIC, 2018). Por muitos anos o diagnóstico para doenças causadas por fungos fitopatogênicos envolveu apenas a identificação morfológica

destes microrganismos, utilizando métodos convencionais demorados e que requerem uma pessoa qualificada e especializada para realizá-los. O uso de técnicas moleculares para diagnosticar doenças em plantas pode resultar em uma análise mais rápida, sensível e precisa, pois enquanto o diagnóstico por morfologia baseia-se em caracteres fenotípicos o diagnóstico molecular é baseado em caracteres genotípicos (AGGARWAL et al., 2011; ASLAM et al., 2017; CAIRNS et al., 2016).

Entre as técnicas moleculares utilizadas no estudo da diversidade genética de fungos fitopatogênicos pode-se citar a reação em cadeia da polimerase (PCR) com *primers* universais do arroz (*Universal Rice Primers*; URP-PCR) (AGGARWAL et al., 2011; MANN, 2010, 2014; MANN et al., 2014). Através de ampliações com *primers* URP é possível produzir fragmentos que são característicos de espécies ou de linhagens e que podem ser estudados para desenvolver uma reação de amplificação com *primers* específicos (AGGARWAL et al., 2011; KANG et al., 2002).

Desta forma, este estudo tem como objetivo buscar, utilizando *primers* URP, sequências comuns no cromossoma de isolados de *Bipolaris sorokiniana* e utilizá-las para desenhar *primers* específicos para identificar esta espécie.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Buscar, utilizando *primers* URP, sequências comuns no cromossoma de isolados de *Bipolaris sorokiniana* e utilizá-las para desenhar novos *primers* específicos para identificar esta espécie.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Identificar os fungos fitopatogênicos utilizados neste estudo.
- 2.2.2 Avaliar a diversidade genética dos isolados de *Bipolaris sorokiniana* e buscar uma sequência em seu cromossoma que permita a diferenciação de outras espécies de fungos fitopatogênicos.
- 2.2.3 Desenhar *primers* específicos para *Bipolaris sorokiniana* para serem utilizados como marcador molecular.
- 2.2.4 Através da técnica de PCR avaliar a especificidade dos *primers* com DNA de diferentes espécies de fungos fitopatogênicos

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A cultura do trigo

A agricultura é considerada um grande salto evolutivo para o homem. O cultivo de sementes alterou o comportamento essencialmente caçador – coletor de nossos ancestrais o que levou ao desenvolvimento da sociedade como hoje conhecemos. Nascida na Mesopotâmia, no período Neolítico (8000 a 5000 a.c.), foi difundida através da prática de diversas técnicas que propiciavam o desenvolvimento de importantes culturas, como o trigo (FELDENS, 2018)

Desde a origem da agricultura, o trigo (*Triticum aestivum*) está presente na dieta dos homens e dos demais animais, pois possui papel relevante na produção de diversos alimentos e bebidas. A farinha de trigo é fonte de carboidratos, proteínas, fibras, cálcio, ferro e ácido fólico, sendo esta utilizada como base na produção de pães, massas, biscoitos, ração e diversos outros produtos, como mostra a figura 1 (Guia Alimentar para a População Brasileira, 2014; RESENDE; VEKIC, 2018).



Figura 1. A pirâmide alimentar do brasileiro, estabelecida através das indicações do Guia Alimentar para a População Brasileira (2014), distribui os alimentos de acordo com suas funções e seus nutrientes. A farinha de trigo e seus derivados são considerados alimentos energéticos, que devem ser consumidos em maior quantidade, constituindo a base da pirâmide.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação e com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística o trigo é o

segundo alimento mais consumido no mundo e está entre os três mais consumidos pela população brasileira. O trigo foi trazido para o Brasil em 1534 e no ano de 1737 para o estado do Rio Grande do Sul e hoje seu plantio é considerado fundamental para a sustentabilidade da economia brasileira. Quando cultivado em sistemas de rotação de culturas contribui para a conservação do solo e também auxilia no controle de doenças e pragas na lavoura (ABITRIGO, 2018a; MANN, 2010; PIRES, 2017; RESENDE; VEKIC, 2018).

No Brasil a produção deste cereal para a safra de 2018/2019 está estimada em 5.239 mil toneladas, 22,9% maior que a safra 2017/2018. No país o trigo é cultivado principalmente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, onde, em eixo regional, o Rio Grande do Sul ocupa o segundo lugar com estimativa de produção de 1.411,1 mil toneladas em setembro de 2018 (SOUZA, 2018). Embora as estimativas de produção sejam promissoras o Brasil ainda importa metade do trigo utilizado na indústria (ABITRIGO, 2018a).

No ano de 2018 o Brasil importou 6.812.399,51 toneladas de trigo. A importação de trigo é feita principalmente da Argentina, que forneceu 5.938.768,16 toneladas, seguida pelo Canadá, China, Estados Unidos, Líbano, Paraguai, Rússia, Uruguai e França, com valor médio de 220,35 US\$/tonelada. Já no âmbito da exportação o país fechou o ano exportando 220.622,60 toneladas de trigo para países como a Tailândia, Vietnã, Filipinas, Ilhas Marshall e Paraguai. Com valor médio de 181,50 US\$/toneladas (ABITRIGO, 2018b).

O grão de trigo, tido como a parte mais valiosa da planta devido a todas as suas aplicações, pode ser dividido em duas partes: pericarpo e semente (EMBRAPA, 2006). As sementes são consideradas um importante veículo de disseminação de patógenos. Um pequeno inóculo de bactérias, nematoides, vírus ou fungos podem ter uma grande significância epidemiológica, ocasionando epidemias nas plantas. Entre os principais patógenos que podem ser encontrados nas sementes, os maiores responsáveis por causar avarias são os fungos (PESKE; ROSENTHAL; ROTA, 2003).

3.2 Fungos fitopatogênicos

Os fungos representam o segundo maior grupo de microrganismos eucarióticos da terra, com uma estimativa que varia de 1,5 milhões a 5,1 milhões de espécies (RAJA et al., 2017,p.756). São microrganismos heterotróficos (saprófitos

ou parasitários), aeróbios ou anaeróbios facultativos, que se alimentam por meio da absorção de nutrientes através da digestão enzimática externa de substâncias orgânicas, sendo caracterizados pela sua falta de pigmento fotossintético e parede celular de quitina. Possuem importante papel na economia, podendo atuar na biorremediação de compostos orgânicos, na produção de antibióticos, enzimas e bebidas e também causando doenças em animais e plantas (BENEVIDES; MARINHO, 2015; GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010).

Estes microrganismos podem crescer na forma unicelular, como por exemplo, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ou podem crescer na forma multicelular, como o fungo filamentosso *Bipolaris sorokiniana* (teleomorfa *Cochliobolus sativus*). Quando são capazes de alternar entre o crescimento unicelular e multicelular são classificados como dimórficos, como por exemplo, *Candida albicans* (ARKOWITZ; BASSILANA, 2015; KÜES; KHONSUNTIA; SUBBA, 2018; MANAMGODA et al., 2014; RAJA et al., 2017).

Os fungos filamentosos são fungos multicelulares compostos por uma cadeia de células interconectadas formando filamentos denominados de hifas. As hifas podem ser septadas ou cenocíticas e em teoria podem crescer indeterminadamente, mas tipicamente se ramificam e se expandem de forma radial para formar uma colônia micelial. As principais hifas periféricas crescem evitando-se mutuamente, possivelmente pela liberação de compostos difusíveis que são inibidores de crescimento. Em contraste, os ramos laterais gerados posteriormente crescem em direção um ao outro e eventualmente podem formar uma rede micelial organizada que permite o fluxo citoplasmático, transporte de água, nutrientes, sinais autoregulatórios e dependendo da situação o transporte de organelas, como núcleos. A reprodução destes fungos, que é coordenada por sinais autoregulatórios da colônia em resposta a condições ambientais, como os nutrientes que compõem o substrato, produz estruturas distintas de desenvolvimento reprodutivo sexual e assexual (KÜES; KHONSUNTIA; SUBBA, 2018).

A reprodução sexual, que ocorre por meiose, resulta na produção de esporos reprodutivos sexuais, enquanto que a reprodução assexual, que ocorre por mitose produz esporos assexuais. Através da avaliação por microscopia das características destes esporos, é realizada a identificação morfológica dos fungos. Entretanto, em laboratório, dificilmente os fungos são cultivados em sua forma sexual (teleomorfa) (RAJA et al., 2017). Na figura 2 é possível visualizar uma colônia

e os esporos assexuais, ou conídios, do fungo filamentososo *Bipolaris sorokiniana*.

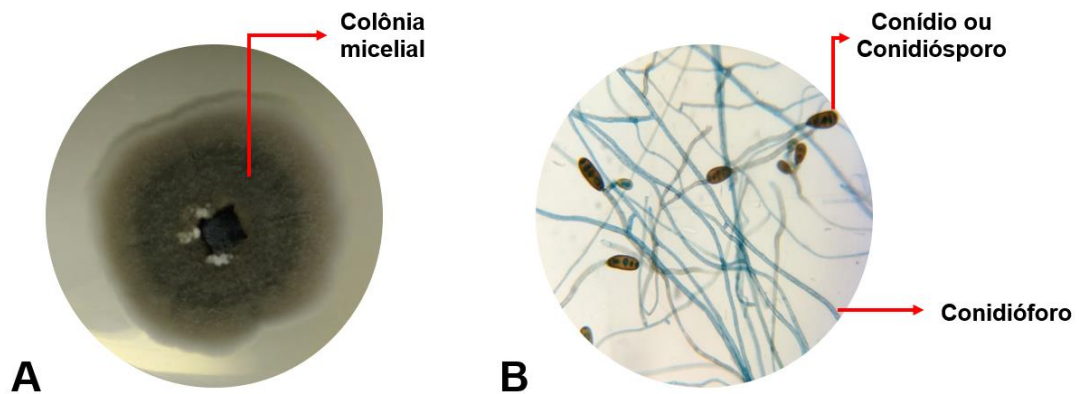


Figura 2. (A) Colônia micelial do fungo filamentososo *Bipolaris sorokiniana*, cultivado em ágar batata dextrose, observado a olho nu. (B) Conídios, ou conidiósporos, e conidióforos, corados com azul de algodão, observados por microscopia em um aumento de 400X. Autor (2019).

Os fungos são considerados os decompositores primários e embora a maioria das espécies sejam saprofitas algumas delas são parasitas de animais e plantas. Estima-se que 15.000 espécies causem doenças em plantas, sendo a maioria delas pertencentes aos Ascomicetos e Basidiomicetos (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010; RAJA et al., 2017). De acordo com o tipo de parasitismo os fungos são classificados como biotróficos (ex., *Blumeria graminis*), necrotótricos (ex., *Botrytis cinera*) ou hemibiotróficos (ex., *Colletotrichum destructivum*). No primeiro caso o fungo parasita um hospedeiro vivo, no segundo o fungo obtém nutrientes de células mortas e no terceiro o fungo realiza sequencialmente um modo de nutrição biotrófico e depois necrotrófico (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010).

As condições climáticas do Brasil como os altos índices de chuvas e temperaturas elevadas favorecem a proliferação de fungos fitopatogênicos nas culturas de trigo. Estes fungos podem atacar as plantas levando ao desenvolvimento de diversas doenças e conseqüentemente a importantes perdas econômicas (FERNANDES; PICININI, 1999; PIRES, 2017). Na agricultura as perdas econômicas anuais atribuídas às doenças fúngicas pré e pós-colheita excedem os €\$ 200 bilhões e apenas nos Estados Unidos são gastos mais de US\$ 600 milhões em fungicidas anualmente (GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ; PRATS; JORRÍN-NOVO, 2010). Todavia as perdas variam de acordo com as condições climáticas de cada ano, sendo que a perda de rendimento por manchas foliares no trigo pode variar de 3% a 80%

(AGGARWAL et al., 2011; FERNANDES; PICININI, 1999).

3.3 Doenças fúngicas do trigo

Na agricultura existem alguns fatores que podem levar a danos ou redução no rendimento da produção sendo um dos mais importantes as doenças. Na cultura do trigo existem diversas doenças que podem ser causadas por fungos fitopatogênicos ocasionando perdas expressivas na produtividade (BERNARDI et al., 2018; KIMATI et al., 1997). A tabela 1, adaptada de Cório da Luz (1987), reúne informações dos gêneros predominantes, espécies mais comuns e tipos de associação dos principais fungos fitopatogênicos das sementes de trigo. Muitos destes fungos são responsáveis por causar grandes perdas, sendo um dos relevantes o fungo *Bipolaris sorokiniana* (MANAMGODA et al., 2014).

Tabela 1. Principais fungos das sementes de trigo.

Fungos	Espécie comum	Teleomorfa	Anamorfa	Tipo de associação
<i>Sclerotium</i> Tode	<i>S. rolfsii</i>	<i>Athelia</i>		Patogênica
<i>Rhizoctonia</i> DC.	<i>R. cerealis</i>	<i>Ceratobasidium</i> sp.		Patogênica
	<i>R. solani</i>	<i>Thanatephorus</i> sp.		
<i>Chaetomium</i> Kunze	<i>C. globosum</i>		<i>Botryotrichum</i> sp.	Saprofítica
<i>Pleospora</i> Rabenh.	<i>P. herbarum</i>		<i>Alternaria</i> <i>Dendryphion</i> <i>Phoma</i> <i>Stemphilium</i>	Saprofítica
<i>Sporobolomyces</i> Kluy. e Niel	<i>S. roseus</i>			Saprofítica
<i>Rhodotorula</i> Harrison	<i>R. rubra</i> <i>R. glutinis</i>	<i>Rhodosporium</i>		Saprofítica
<i>Phoma</i> Sacc.	<i>P. glomerata</i> <i>P. herbarum</i> <i>P. exigua</i>	<i>Leptosphaeria</i> <i>Pleospora</i> <i>Didymella</i>		Algumas espécies patogênicas
<i>Septoria tritici</i>		<i>Mycosphaella</i>		Patogênica

Rob.	<i>graminicola</i> (Füchel) Schroeter	
<i>Stagonospora nodorum</i> (Berk.) Cast. e Germ.	<i>Phaeosphaeria nodorum</i> (Müller) Hedja.	Patogênica
<i>Stagonospora avenae</i> (Frank) Bisset f. sp. <i>triticea</i>	<i>Phaeosphaeria Avenaria</i> (Weber) O. Eriks f. sp. <i>triticea</i>	Patogênica
<i>Colletotrichum graminicola</i> (Ces.) Wilson	<i>Glomerella tucumanensis</i>	Patogênica
<i>Fusarium tricinctum</i> (Corda) Sacc		Patogênica
<i>Fusarium moliniforme</i> Sheldon	<i>Gibberella fujikuroi</i> (Sawada) Wollenw	Saprofítica
<i>Fusarium avenaceum</i> (Fr.) Sacc	<i>Gibberella Avenacea</i> Cooke	Patogênica
<i>Fusarium acuminatum</i> Ell. e Kellerm	<i>Gibberella acuminata</i> Wr.	Saprofítica
<i>Fusarium equiseti</i> (Corda.) Sacc	<i>Gibberella intricans</i> Wollenw	Saprofítica
<i>Mucor Micheli</i>	<i>M. hiemalis</i> <i>M. circinelloides</i> <i>M. racemosus</i>	Saprofítica
<i>Rhizopus</i>	<i>R. stolonifer</i>	Saprofítica

Ehrenb.	<i>R. oryzae</i>		
<i>Aspergillus</i> Link	<i>A. flavus</i> <i>A. niger</i> <i>A. clavatus</i> <i>A. fumigatus</i>	<i>Eurotium</i> <i>Sartorya</i> <i>Emericella</i>	Saprobílica
<i>Penicillium</i> Link	<i>P. notatum</i> <i>P. expansum</i>	<i>Eupenicillium</i> <i>Talaromyces</i> <i>Hamigera</i> <i>Penicilliosis</i> <i>Trichocoma</i>	Saprobílica
<i>Alternaria</i> Nees	<i>A. alternata</i>	<i>Pleospora</i> <i>Clathrospora</i>	Patogénica
<i>Epicoccum</i> Link	<i>E.</i> <i>purpurascens</i>		Saprobílica
<i>Clodosporium</i> Link	<i>C. herbarum</i> <i>C.</i> <i>clodosporoide</i>	<i>Mycosphaerella</i>	Saprobílica
<i>Nigrospora</i> Zimm.	<i>N. sphaerica</i> <i>N. oryzae</i>	<i>Apiospora</i>	Saprobílica
<i>Curvularia</i> Boedijn	<i>C. lunata</i>	<i>Cochliobolus</i>	Saprobílica
<i>Drechslera</i> <i>tritici-repentis</i> (Died.) Drech		<i>Pyrenophora</i> <i>tritici-repentis</i> (Died.) Drech	Patogénica
<i>Bipolaris</i> <i>sorokiniana</i> (Sacc. In Sorok). Shoem		<i>Cochliobolus</i> <i>sativus</i> (Ito e Kurib) Drech. Ex Dastur	Patogénica

O gênero *Bipolaris* contém aproximadamente 45 espécies que estão distribuídas mundialmente. A maioria delas é patogénica para plantas e estão comumente associados a doenças como manchas e ferrugem nas folhas, podridão e putrefação das raízes e outros sintomas que acometem culturas de grande valor econômico como arroz (*Bipolaris oryzae*), milho (*Bipolaris maydis*), trigo e cevada (*Bipolaris sorokiniana*), entre outras. Este gênero de fungo pertence ao filo Ascomycota, classe Deuteromicetos, ordem Pleosporales e família Pleosporaceae.

São fungos filamentosos que contém hifas septadas e conídios que são produzidos em longas cadeias a partir do conidióforo. A sua forma sexual, o gênero *Cochliobolus*, é raramente encontrado na natureza, mas pode ser produzida em condições laboratoriais (MANAMGODA et al., 2014).

Bipolaris sorokiniana pode afetar diversas culturas como centeio, cevada, trigo e tritcale. No Brasil este patógeno é de grande importância encontrando-se disseminado por todas as regiões tritícolas (KIMATI et al., 1997). No ano de 1990, durante a conferência “Trigo para as áreas quentes e não tradicionais”, realizada no Brasil, a espécie *Bipolaris sorokiniana* foi declarada o fungo fitopatogênico foliar mais importante do ponto de vista econômico para a cultura de trigo, ao redor de todo o mundo (MANAMGODA et al., 2014).

Quando cultivado em ágar batata dextrose (BDA) esta espécie apresenta conidióforos e conídios cor marrom escuro para dourado pálido (Figura 3). Os conidióforos são septados e podem estar solitários ou em grupos medindo de 100 – 400 μm x 6,8 μm . Os conídios podem crescer curvados ou retos e podem apresentar extremidades cônicas, medindo de 40 – 72 μm x 15 - 25 μm . As colônias deste fungo são aveludadas e acinzentadas, com bordas irregulares ou onduladas, verificando-se esporulação abundante após uma semana de crescimento (MANAMGODA et al., 2014).

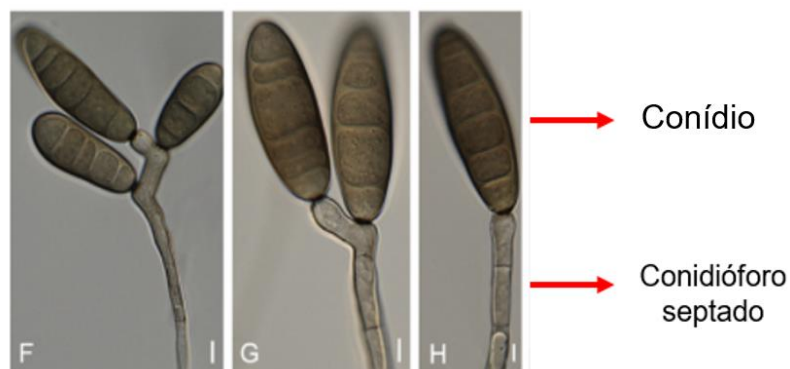


Figura 3. De (F) a (H) conidióforos e conídios do fungo fitopatogênico *Bipolaris sorokiniana*. Adaptado de Manamgoda et al. (2014).

Bipolaris sorokiniana é o principal fungo que causa a podridão comum das raízes, porém essa doença também pode ser causada pelo fungo *Fusarium graminearum*. O sintoma mais comum é a descolorização dos tecidos radiculares que se tornam pardos (Figura 4). Esta descoloração segue até alcançar a coroa da planta e quando atinge a base da planta mata precocemente as folhas basais. A

principal fonte do inóculo é a semente infectada (KIMATI et al., 1997).



Figura 4. Nas duas raízes a esquerda é possível observar a coloração parda, que é o sintoma comum da podridão comum das raízes, quando comparada a coloração sadia das duas raízes à direita (FERNANDES, 2013).

Quando acomete as sementes do trigo *Bipolaris sorokiniana* causa a doença denominada mancha marrom ou helmintosporiose. A helmintosporiose pode ocorrer em qualquer parte ou estágio de crescimento do trigo. Lesões necróticas pardas, com um a dois milímetros de comprimento, podem ser observadas já nas primeiras folhas devido à transmissão da doença pelas sementes, que quando infectadas apresentam a ponta do escudete negro (Figura 5). Em regiões frias as lesões costumam ser retangulares e escuras e em regiões quentes elípticas e cinzas. No clima húmido ocorre a frutificação do fungo nas lesões mais velhas, sendo possível observar os conidióforos e os conídios. As principais fontes de inóculo são as sementes, restos culturais, plantas voluntárias, hospedeiros secundários e conídios dormentes no solo (FERNANDES; PICININI, 1999; KIMATI et al., 1997).

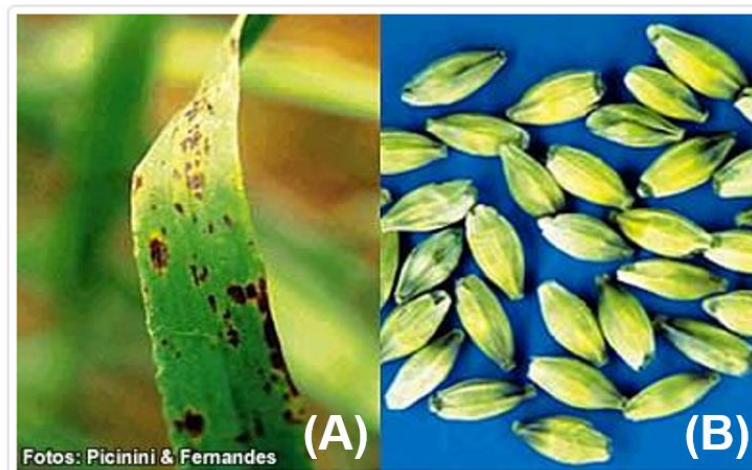


Figura 5. Na imagem (A) é mostrado o sintoma da helmintosporiose na folha do trigo, com a formação de manchas marrom e na imagem (B) o sintoma da doença quando acomete as sementes, que apresentam as pontas negras (PICININI; FERNANDES, [s.d.]).

As sementes infectadas por fungos fitopatogênicos servirão como fonte de inóculo para o estabelecimento de focos iniciais de doenças em outros ciclos e localidades de produção, sendo assim, o manejo fitossanitário é um fator crucial para o desenvolvimento de plantas saudáveis. O uso de cultivares resistentes a doenças é a estratégia preferencial para evitar perdas na produção. No entanto, quando não há cultivares resistentes as medidas tomadas para reduzir o inóculo dos patógenos são eliminação de plantas voluntárias, rotação de culturas, produção de sementes saudáveis e tratamento das sementes com fungicidas. Para evitar as perdas causadas por *Bipolaris sorokiniana*, em geral, o controle recomendado é a utilização de fungicidas, tanto para o tratamento de sementes como para a doença já estabelecida na lavoura. O monitoramento para a presença deste fungo deve ser semanal e o tratamento com fungicida é indicado para qualquer percentual de presença deste fitopatógeno (KIMATI et al., 1997; SILVA; BASSOI; FOLINI, 2017).

O ano de 2020 foi declarado pela ONU como Ano Internacional da Defesa Fitossanitária. A disseminação dos patógenos ao redor do mundo é um fator preocupante e uma correta identificação destes é necessária para o tratamento adequado das doenças, o que pode diminuir a utilização de agrotóxicos, que quando utilizados incorretamente podem causar danos à saúde e ao meio ambiente (BENEVIDES; MARINHO, 2015; FAO; IPPC, 2018; RESENDE; VEKIC, 2018).

3.4 Técnicas moleculares para a identificação de fungos

A identificação morfológica dos fungos fitopatogênicos é a medida de manejo rotineiramente utilizada. Esta metodologia convencional requer tempo e pode não funcionar para identificação em nível de espécie, pois para algumas linhagens de fungos a análise dos caracteres pode ser controversa e problemática até para micologistas treinados (ASLAM et al., 2017; RAJA et al., 2017).

Devido às limitações dos métodos convencionais as técnicas moleculares surgiram como ferramentas para superar os problemas e auxiliar no processo de identificação. Estas técnicas baseiam-se na análise de caracteres genotípicos e incluem métodos baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), métodos baseados em sondas de DNA/RNA (ácido desoxirribonucleico/ácido ribonucleico), métodos baseados em técnicas pós amplificação, métodos baseados em amplificação isotérmica e métodos baseados em sequenciamento de nova geração. A tabela 2, adaptada de Aslam et al. (2017), descreve o princípio do método, vantagens, desvantagens e alguns fungos fitopatogênicos que podem ser identificados através de técnicas moleculares baseadas em PCR.

Tabela 2. Técnicas moleculares baseadas em PCR que são utilizadas na identificação de fungos fitopatogênicos

Técnicas moleculares	Princípio do método	Vantagens	Desvantagens	Exemplos
PCR convencional	Sintetizar milhões de cópias de um segmento do DNA utilizando <i>primers</i> específicos através de ciclos alternados de desnaturação, anelamento e alongamento.	Resultados rápidos e precisos	Método oneroso e trabalhoso	<i>Mycosphaerella musicola</i> <i>M. fijiensis</i>
<i>Nested</i> PCR	Neste método, duas rodadas consecutivas de amplificação ocorrem. Um único par de <i>primers</i> é usado para amplificar uma grande região	O uso de dois conjuntos de <i>primers</i> aumenta o rendimento e especificidade de amplificação do DNA alvo	Método trabalhoso que apresenta risco de contaminação, devido a dois ciclos de amplificação	<i>Phytophthora palmivora</i> <i>P. parasitica</i>

de DNA, então esta seqüência amplificada atua como um alvo para a segunda rodada usando dois *primers* internos.

Multiplex PCR	Utiliza vários pares de <i>primers</i> na mesma reação que permite a detecção simultânea de diferentes seqüências de DNA	Economia de tempo e dinheiro	Interferência de <i>primers</i> e sondas pode reduzir a sensibilidade	<i>Fusarium oxysporum</i> <i>Bipolaris cactivora</i> <i>Phytophthora nicotinae</i>
Transcriptase Reversa PCR (RT – PCR)	Primeiramente o RNA é reversamente transcrito em cDNA pela enzima Transcriptase Reversa (RT) e então amplificado por PCR	Fornecer dados quantitativos sobre patógenos, mais sensível que a PCR convencional	Preparação demorada do ensaio, requer equipamento e reagentes caros	<i>Fusarium graminearum</i>
PCR quantitativo em tempo real (q PCR)	Monitoramento das reações de amplificação utilizando corantes e sondas fluorescentes que se intercalam no DNA gerando um sinal que aumenta à medida que o DNA é amplificado	Automatizado e sem necessidade de análise pós amplificação	Alto custo e complexidade devido a simultaneidade entre o ciclo térmico e a detecção da fluorescência	<i>Aspergillus versicolor</i> <i>Cladosporium cladosporioides</i> <i>Stachybotrys chartarum</i>
DNA <i>barcoding</i>	Sequenciamento de um pequeno segmento de DNA que permite identificar espécies	Permite sequenciar o DNA de espécies nos estágios do ciclo de vida em que não é possível a identificação morfológica	Dependente da composição dos bancos de dados	<i>Alternaria alternate</i> Diversas espécies

Os três genes ribossômicos usualmente utilizados para a identificação dos fungos provém da maior subunidade do DNA ribossomal (nrLSU-26S ou 28S) e da menor subunidade (nrSSU-18S). Entretanto o uso da região dos espaçadores internos transcritos (ITS) estabeleceu uma nova era na identificação de seqüências

filogenéticas dos fungos e é hoje considerada como DNA *barcoding* para a identificação destes microrganismos (RAJA et al., 2017).

Barcoding é um pequeno segmento de DNA utilizado para identificar espécies. É uma técnica emergente que oferece vantagens como facilitar a identificação de espécies em qualquer fase do ciclo de vida, permite a descoberta de espécies com base na análise filogenética de sequências de ácidos nucleicos, elucidar sobre a diversidade dos seres vivos e promover o desenvolvimento de ferramentas moleculares úteis para o estudo da biodiversidade (ASLAM et al., 2017). Entretanto, a identificação de espécies utilizando DNA *barcodings* depende da composição e acurácia dos bancos de dados e não proporciona informações quanto à variabilidade genética de populações da mesma espécie (ASLAM et al., 2017; RAJA et al., 2017).

O monitoramento das doenças nas lavouras desempenha um papel fundamental no combate contra a disseminação dos organismos patogênicos. A identificação rápida e precisa dos fungos que causam as doenças auxilia na definição das estratégias de manejo (AGGARWAL et al., 2011). As técnicas moleculares utilizadas para o diagnóstico de doenças em plantas precisam ser robustas, confiáveis, baratas e fáceis de serem usadas (ASLAM et al., 2017)

A sociedade Brasileira de Genética define marcadores moleculares como um segmento específico de DNA representativo das diferenças em nível do genoma que permitem fazer inferências diretas sobre a diversidade genética e inter-relações entre os organismos em nível do DNA.

Os marcadores moleculares podem ser divididos em três categorias: marcadores baseados em hibridização, marcadores baseados em sequenciamento e marcadores baseados em PCR. Também podem ser classificados de acordo com o tipo de herança alélica em dominantes e codominantes. Os marcadores baseados em hibridização têm como princípio do método o pareamento de bases complementares, como por exemplo os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e DArT (*Diversity arrays technology*). Os marcadores baseados em sequenciamento têm como princípio do método o sequenciamento de fragmentos em plataformas de sequenciamento, como por exemplo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Os marcadores baseados em PCR têm como princípio do método a amplificação de sequências específicas do DNA, tais como os marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), ISSR (*Inter-simple*

sequence repeats), SSR (*Simple Sequence Repeats*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (TURCHETTO-ZOLET et al., 2017).

A escolha do tipo de marcador a ser utilizado deve levar em consideração a quantidade necessária de DNA, o conhecimento técnico, questões monetárias e estrutura do laboratório. Os marcadores moleculares baseados em PCR não requerem grande quantidade de DNA, são relativamente rápidos e de fácil revelação através de gel de agarose ou poliacrilamida (KANG et al., 2002; TURCHETTO-ZOLET et al., 2017). Estes marcadores podem ser úteis para desenvolver métodos de detecção que sejam rápidos e precisos (ASLAM et al., 2017; KANG et al., 2002).

Universal Rice Primer – PCR (URP – PCR) é uma técnica de amplificação que foi desenvolvida com base na sequência repetitiva pKRD, isolada de uma biblioteca construída com amostras de DNA genômico de arroz Weddy, ou arroz vermelho. Esta técnica permite a amplificação de regiões inespecíficas do DNA de procariotos e eucariotos através do uso de diferentes *primers* que possuem 20 nucleotídeos. Cada *primer* pode gerar perfis de amplificação característicos possibilitando o estudo de diversidade em níveis inter e intraespecíficos (KANG et al., 2002).

Utilizando os *primers* URP é possível produzir fragmentos que são característicos de espécies ou de linhagens e que podem ser estudados para desenvolver uma reação de amplificação com *primers* específicos (AGGARWAL et al., 2011; KANG et al., 2002). Estes *primers* específicos podem ser utilizados para detectar a presença de fungos fitopatogênicos, como o fungo *Bipolaris sorokiniana*, sem a necessidade de isolá-lo quando associado a plantas, promovendo mais uma ferramenta de auxílio ao combate da disseminação do patógeno (AGGARWAL et al., 2011; ASLAM et al., 2017; KANG et al., 2002)

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos isolados de fungos fitopatogênicos

Para a realização deste estudo foram utilizadas amostras de 16 gêneros de fungos filamentosos fitopatogênicos (Tabela 3) e uma espécie de semente de trigo. Os fungos foram isolados a partir de plantas de diversas regiões do Brasil e de outros países, oriundos das coleções de isolados do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFRGS, Laboratório de Microbiologia da UFPel, CIMYTT–México e CNTP – Embrapa (Passo Fundo), sendo este último cedente de isolados fúngicos e sementes.

Tabela 3. Isolados fúngicos e sua origem

Gênero	Código do isolado	Laboratório de origem	Localização de origem	Planta de origem
<i>Alternaria</i>	LMA323AL_1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323AL_2	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323AL_3	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323AL_4	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323AL_5	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Aspergillus</i>	LMA323AS_1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323AS_2	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323AS_3	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	Feijão
<i>Bipolaris</i>	LMA323BIO1	UFPel	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	Arroz
	LMA323BIS1	UFPel	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323BIS2	Embrapa	Buri, São Paulo, Brasil	Cevada

	LMA323BI_C1/08 -2	Embrapa	Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323BIS903	Embrapa	Uberaba, Minas Gerais, Brasil	Trigo
	LMA323BIS9800 4P		Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323BIS9800 7P		Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323BIS9801 2P		Lagoa Vermelha, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323BIS9802 8P		Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323BIS9803 4P		Vitória, Paraná, Brasil	Trigo
	LMA323BI_98041 P		Vitória, Paraná, Brasil	Trigo
	LMA323BISA20P		Saskatoon, Saskatchewan, Canadá	
	LMA323BI_15M2 P	CIMYTT	Delicias, Chihuahua, México	Trigo
	LMA323BI_18M2 P	CIMYTT	Poza Rica, Veracruz, México	Trigo
	LMA323BI_CF02 01P		África do Sul	Trigo
<i>Cercospora</i>	LMA323CE_1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323CE_2	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Diaporthe</i>	LMA323DI_1	UFPEl	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	Soja
<i>Drechslera</i>	LMA323DR_27	Embrapa	Vacaria, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323DR_45	Embrapa	Três de Maio, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323PY_48	Embrapa		Azevém
	LMA323DR_C1/0 8-5	Embrapa	Ponta Porã, Mato Grosso do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323DR_C1/0 8-11	Embrapa	Maringá, Paraná, Brasil	Trigo
<i>Exserohilum</i>	LMA323EX_1	UFPEl	Pelotas, Rio	Arroz

<i>Fusarium</i>	LMA323FU_1		Grande do Sul, Brasil Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	Arroz
	LMA323FU_2	Embrapa	Arapuá/Coamo, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323FU_3	Embrapa	São Luiz Gonzaga, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323FU_4	Embrapa	Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil	Trigo
	LMA323FU_09M134	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Gerlachia</i>	LMA323GE_1	UFPeI	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil (UFPeI)	Arroz
<i>Macrophomina</i>	LMA323MAP1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	Arroz
<i>Paecilomyces</i>	LMA323PA_1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Penicillium</i>	LMA323PE_12	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
	LMA323PE_13	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Rhizoctonia</i>	LMA323RIC_1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Rhizopus</i>	LMA323RIP_1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Sclerotinia</i>	LMA323SCS1	UFRGS	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.	
<i>Ulocladium</i>	LMA323UL_1	UFPeI	Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil	Arroz

4.2 Identificação morfológica

A identificação dos isolados fúngicos mediante observação dos caracteres morfológicos foi realizada com o crescimento dos isolados em meios de cultura e microcultivo.

4.2.1 Crescimento em meio de cultivo

Quarenta e seis isolados foram repicados em placas contendo Ágar Batata Dextrose (BDA). Os isolados foram incubados em estufa de crescimento microbiológico em temperatura controlada de 28°C, sem exposição a luminosidade, por um período de 5 dias. Os caracteres morfológicos observados foram cor e textura das colônias miceliais.

4.2.2 Microcultivo

Quarenta e cinco isolados foram submetidos separadamente a microcultivo em meio BDA. As câmaras úmidas foram preparadas com lâminas de vidro e algodão e esterilizadas. Para a realização do microcultivo uma porção de meio de cultura BDA foi disposto sobre a lâmina. Após, a inoculação do isolado foi realizada nas laterais do meio, e sobre ele, foi depositada uma lamínula de vidro estéril (HÖFLING; GONÇALVES, 2008). Água estéril foi utilizada para umedecer o algodão e assim propiciar uma condição de câmara úmida para o crescimento dos fungos. As câmaras foram incubadas em estufa de crescimento microbiológico em temperatura controlada de 28°C, sem exposição a luminosidade, por um período de pelo menos 7 dias. Após o crescimento do isolado a lamínula foi depositada sobre uma lâmina limpa e corada com corante azul de algodão e as estruturas reprodutivas foram visualizadas por microscopia em um aumento de 400X.

Os isolados que não desenvolveram esporos em meio BDA foram crescidos nos meios V8 Batata Dextrose Ágar (V8-BDA - 150 mL de suco V8 Original, 10 g de ágar, 10 g de ágar batata dextrose, 3 g de CaCO₃, 850 mL de água destilada) e Ágar Cenoura (CA - Caldo de 200g de cenouras cozidas e trituradas, 4 g de ágar, 200 mL de água destilada) e então foram submetidos ao microcultivo nos mesmos meios de cultura. Todos os microcultivos foram realizados em duplicata.

4.3 Extrações de DNA genômico

A identificação mediante análise dos caracteres genômicos, estudo da diversidade genômica e reações de amplificação com *primers* específicos foram realizadas com DNA extraído dos isolados fúngicos e das sementes de trigo.

4.3.1 Cultivo dos isolados fúngicos em meio líquido

Quarenta e seis isolados foram cultivados separadamente em

Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de caldo Sabouraud. Os isolados foram incubados a temperatura controlada de 28°C, sob agitação de 100 rpm, por um período de 5 dias ou até atingirem peso de massa micelial superior a 1 g.

4.3.2 Extração de DNA genômico dos isolados fúngicos

A extração de DNA dos isolados fúngicos foi realizada seguindo o protocolo descrito por Ashktorab e Cohen (1992) com algumas modificações. Após o cultivo em meio líquido, a massa micelial de cada isolado foi lavada três vezes com água destilada estéril para retirar o meio de cultivo excedente. A massa lavada foi depositada em papel filtro para secagem, à temperatura ambiente por aproximadamente 16h. As amostras secas foram maceradas com nitrogênio líquido até a granulometria de pó. Em um microtubo de 2 mL foi pesado 0,1 g de cada amostra macerada e a ela adicionado 1 mL de tampão lise-extração (200 mM Tris-Cl pH 8, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 2% SDS) pré-aquecido em banho de água. Ao microtubo com tampão foram adicionados 10 µL/mL de β-mercaptoetanol e 50 µg/mL de proteinase K. A mistura foi incubada a 65°C em banho de água durante 1 h, invertendo-se gentilmente a cada 15 min. Após a incubação, o conteúdo do microtubo foi centrifugado a 2795 g, por 20 min. O sobrenadante foi retirado e dispensado em um novo microtubo. Ao sobrenadante foi adicionado 1 volume de fenol tamponado e o conteúdo foi homogeneizado e centrifugado a 2795 g, por 20 min. O sobrenadante foi retirado e o procedimento repetido uma vez com fenol, duas vezes com fenol – clorofórmio (1:1), e uma vez com clorofórmio – álcool isoamílico (24:1). A fase aquosa resultante foi separada em um novo microtubo e a ela foi adicionado 50 µg/mL de RNase pancreática. O microtubo foi incubado a 37°C em banho de água por 20 min. O DNA foi precipitado com 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volume de isopropanol gelado. A amostra foi incubada a -20°C por 16 – 18 h. Após este período o microtubo foi centrifugado a 2795 g, por 20 min e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi lavado com álcool 70% (-20°C) e então centrifugado a 2795 g, por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi seco em temperatura ambiente. O DNA foi resuspenso em 100 µL de água Milli-Q estéril e armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.3.3 Assepsia das sementes de trigo

A assepsia da superfície das sementes de trigo foi realizada com a

imersão das sementes por um período de 3 minutos em uma solução 2% de hipoclorito de sódio, seguida por 3 lavagens com água destilada estéril (AGGARWAL et al., 2011).

4.3.4 Extração de DNA genômico de trigo

A extração de DNA das sementes de trigo foi realizada seguindo o protocolo descrito por Bonato (2008) com algumas modificações. Após a assepsia das sementes, estas foram maceradas com nitrogênio líquido até a granulometria de pó. Em um microtubo de 2 mL foram pesadas 0,3 g de amostra macerada e a ela foi adicionada 1 mL de tampão de extração CTAB (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 100 mM Tris-Cl pH 8, 20 mM EDTA e Água Milli-Q para completar o volume) pré-aquecido em banho de água. As amostras foram incubadas a 65°C em banho de água por 1 h, invertendo-se gentilmente a cada 10 min. Após o tempo de incubação o conteúdo do microtubo foi resfriado por 5 min em temperatura ambiente. À esta mistura foi adicionado 700 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (24:1). O microtubo foi invertido gentilmente por 10 min. O mesmo foi centrifugado a 12212 g, por 7 min. O sobrenadante foi retirado e dispensado em um novo microtubo e o procedimento com clorofórmio – álcool isoamílico foi repetido uma vez. O sobrenadante foi retirado e a ele foi adicionado 500 µL de isopropanol (-20°C). O conteúdo foi misturado para que houvesse a precipitação do DNA e posteriormente incubado a -20°C por 1 h. O conteúdo do microtubo foi centrifugado a 12212 g, por 5 min e o sobrenadante foi descartado. O DNA foi lavado com 600 µL de álcool 70% (-20°C) e posteriormente lavado com 600 µL de álcool 96%. O DNA foi seco em temperatura ambiente. O DNA foi resuspenso em 100 µL de TE (100 mM Tris-Cl pH 8 e 10 mM EDTA pH 8) e a ele foi adicionado 3 µL de RNase pancreática na concentração de 10 mg/mL. Essa suspensão foi incubada a 37°C por 1 h e depois o DNA foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.3.5 Análise da qualidade e quantificação do DNA

A qualidade das extrações de DNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0.8%. Foram utilizados 4 µL de DNA extraído corados com 0,5 µL de GelRed (Quatro G). As corridas foram realizadas por um período de 40 minutos a 80 volts, 80 miliampere e 80 watts. A revelação do gel foi registrada pelo gerador de imagens SmartView Pro (UVCI 1200 – Major Science). A concentração do DNA foi

medida utilizando o Nano Espectrofotômetro KASVI (K23-0002 versão 01/13).

4.4 Identificação genotípica

Os isolados que não foram identificados através do microcultivo e identificados como *Bipolaris* foram submetidos ao sequenciamento da região ribossomal ITS1, 5.8S, ITS2 (WHITE et al., 1990).

4.4.1 ITS – PCR

Para amplificar a região ITS para o sequenciamento dos isolados foram preparadas reações em um volume final de 25 µL, contendo: 5 pmol de cada *primer* (Tabela 4) descritos por White et al. (1990), 50 ng de DNA, 1X tampão de reação, 2 mM de MgCl₂, 1,25 mM de cada desoxirribonucleotídeo fosfatado (dNTP), 1 U Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril para completar o volume. As amplificações foram realizadas em um termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um ciclo inicial de desnaturação de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto e terminando com uma extensão a 72°C por 5 minutos.

Tabela 4. Sequência de *primers* ITS.

Primer	Sequência (5' → 3')
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC

4.4.2 Eletroforese em gel de agarose

Os resultados das amplificações foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1%. Foram utilizados 4 µL de produto de PCR corados com 0,5 µL de GelRed (Quatro G) e 2 µL de Ladder 100bp (Ludwig Biotec) como marcador molecular. As corridas foram realizadas por um período de 1 hora, utilizando os parâmetros de 80 volts, 80 miliampere e 80 watts. A revelação do gel foi registrada pelo gerador de imagens SmartView Pro (UVCI 1200 – Major Science).

4.4.3 Análise das sequências

Os resultados obtidos com o sequenciamento de Sanger das regiões ITS1, 5.8S, ITS2, realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, foram comparados com sequências

depositadas nos bancos de dados do NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e MycoBank (<http://www.mycobank.org/>) (RAJA et al., 2017). Para o isolado ser identificado em nível de espécie a sequência da região ITS deveria ter identidade $\geq 98\%$ com as sequências dos bancos de dados e para ser identificado em nível de gênero ter identidade $\geq 80\%$.

4.5 Desenvolvimento de metodologia de identificação molecular

Em busca de uma sequência comum apenas para os isolados de *Bipolaris sorokiniana* foram realizadas amplificações com *primers* URP utilizando o DNA de alguns isolados fúngicos dos gêneros *Bipolaris*, *Cercospora*, *Alternaria*, *Drechslera*, *Exserohilum* e DNA de semente de trigo.

4.5.1 URP – PCR

Foram realizadas separadamente reações com os *primers* URP 6R e 38F (Tabela 5) descritos por Kang et al. (2002). As reações foram preparadas em um volume final de 25 μL , contendo: 20 pmoL de cada primer, 50 ng de DNA genômico, 1 x tampão de reação, 4 mM MgCl_2 , 0,2 mM de cada dNTP, 200 ng/ μL albumina bovina, 1 U *Taq* DNA polimerase e água Milli-Q estéril para completar volume. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto, alongamento a 72°C por 2 minutos, e extensão final a 72°C por 7 minutos. As amplificações foram repetidas mais de uma vez para cada amostra em experimentos separados.

Tabela 5. Sequências de *primers* URP

Primer	Sequência (5' – 3')
URP 6R	GGCAAGCTGGTGGGAGGTAC
URP 38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC

4.5.2 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos da amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 4 μL de produto de PCR corados com 0,5 μL de GelRed (Quatro G) e 2 μL de Ladder 100bp (Ludwig Biotec) como marcador molecular. As corridas foram realizadas por um período de 3 horas utilizando os parâmetros de 70 volts, 80 miliampere e 80 watts. A revelação do gel foi registrada

pelo gerador de imagens SmartView Pro (UVCI 1200 – Major Science).

4.6 Desenvolvimento de *primers* específicos para *Bipolaris sorokiniana*

Para desenhar os *primers* específicos para *Bipolaris sorokiniana* foi necessário estudar as sequências contidas nos fragmentos comuns gerados pelas ampliações com os *primers* URP. Para isto, estes fragmentos foram extraídos e purificados do gel de agarose, clonados e sequenciados.

4.6.1 Purificação dos fragmentos monomórficos

Os fragmentos gerados pelas ampliações com os *primers* URP que apresentaram padrão monomórfico para os isolados do fungo *Bipolaris sorokiniana* foram separados em um gel de agarose 1,5% conforme descrito anteriormente, extraídos e purificados com Kit de Purificação Quick Gel Extraction & PCR Pure Link™ (Invitrogen).

Para verificar a qualidade da purificação dos fragmentos os mesmos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,8%.

4.6.2 Preparação de células competentes com cloreto de cálcio

A preparação de células competentes foi realizada seguindo o protocolo descrito por Green e Sambrook (2012) com algumas modificações. Células de *Escherichia coli* D5Hα foram inoculadas em Ágar Luria–Bertani (LB Ágar) e incubadas por 16 – 20 h a 37°C. Uma colônia isolada desse crescimento foi inoculada em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 50 mL de caldo LB e incubada a 37°C e 100 rpm, durante a noite. Uma alíquota de 2,5 mL desta cultura foi inoculada em um novo Erlenmeyer contendo 50 mL de caldo LB e incubado a 37°C e 100 rpm por um período de aproximadamente 2 h, ou até a concentração de células atingir $1,5 \times 10^8$ bactérias da escala de Mc Farland. Após o período de incubação o crescimento foi transferido para microtubos gelados e o conteúdo foi incubado no gelo por 10 min. As células foram centrifugadas a 2700 g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente por 1 min. O *precipitado* foi ressuspenso em 1,2 mL com uma solução de MgCl₂ - CaCl₂ (80 mM – 20 mM) gelada e o conteúdo foi gentilmente agitado em agitador elétrico. As células foram centrifugadas a 2700 g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e o precipitado foi seco a temperatura ambiente. Este procedimento com a solução

de $MgCl_2 - CaCl_2$ gelada foi repetido uma vez. As células foram ressuspensas em 800 μL de 0,1 M $CaCl_2$ gelado e incubadas por 1 h no gelo para serem utilizadas no processo de transformação.

4.6.3 Reação de clonagem

Os fragmentos de DNA purificados utilizados nas reações de clonagem são do isolado LMA323BIS2, controle positivo de *B. sorokiniana*. Para facilitar a ligação do vetor de clonagem com os fragmentos de DNA purificados foram adicionadas caudas poli A nestes fragmentos, através da incubação de 10 μL de DNA e 1 U *Taq* DNA polimerase, por 10 min, a 72°C, em um termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific).

Em um microtubo de 200 μL foram adicionados 4 μL do DNA tratado, 1 μL de solução salina e 1 μL do vetor pCR®2.1-TOPO® (Figura 6), para cada fragmento. As reações foram incubadas durante 45 min a temperatura ambiente.

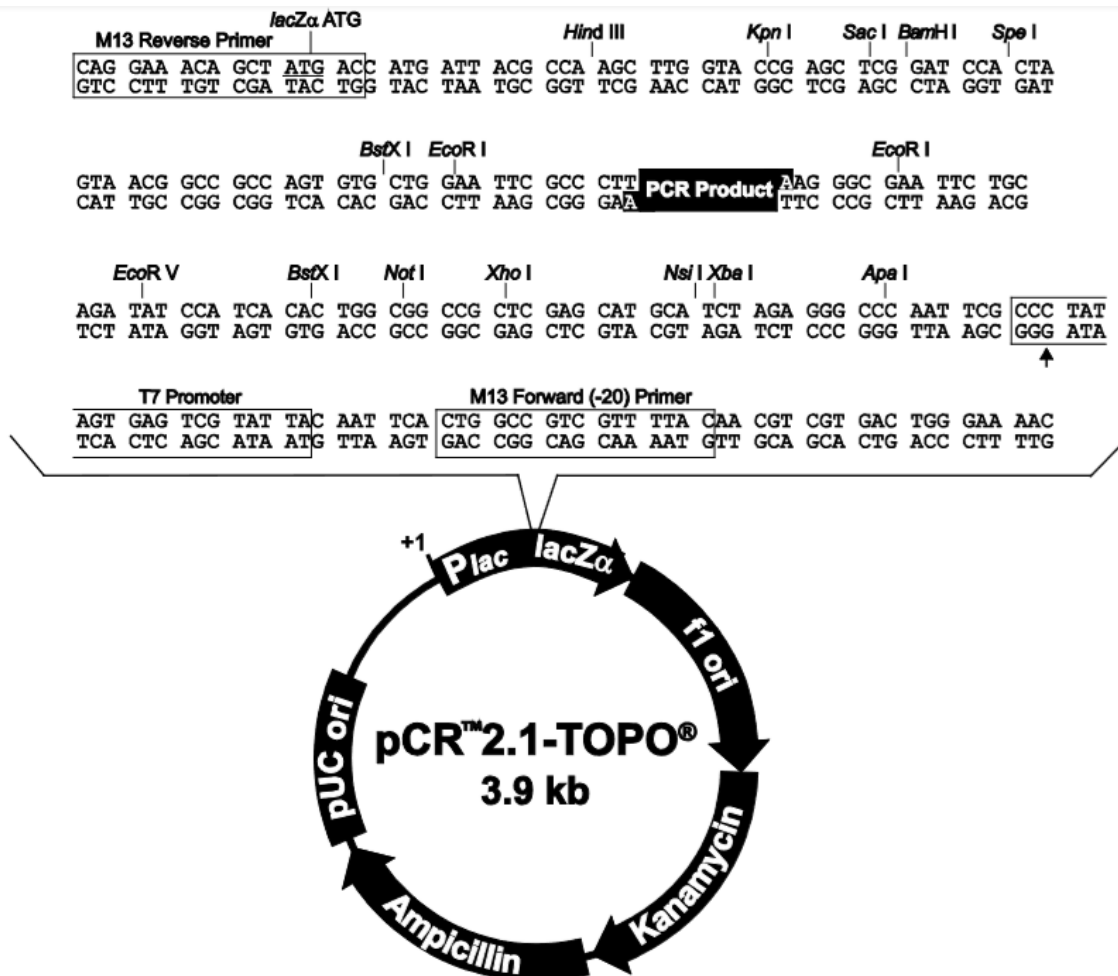


Figura 6. Mapa do vetor pCR[®]2.1-TOPO[®] destaca a localização do inserto, assim como a localização de endonucleases de restrição e dos *primers* M13 INVITROGEN (2014).

4.6.4 Transformação por choque térmico

Em microtubos de 2 mL foram misturados 2 µL da reação de clonagem com 1,6 mL de células competentes geladas. Esta mistura foi realizada separadamente para cada reação de clonagem. As misturas foram incubadas no gelo por 1 h. O choque térmico consistiu em retirar a mistura do gelo e incubar imediatamente em banho de água a 45°C por 90 segundos e incubar imediatamente no gelo novamente. Para promover a multiplicação das células de *E. coli* foram adicionados 250 µL de caldo LB a cada mistura e os microtubos foram incubados sob agitação de 200 rpm a 37°C por 1 h. 50 µL de cada crescimento foram semeados pelo método de espalhamento em meio LB acrescido de 50 µg/mL de ampicilina e então incubados a 37°C durante a noite.

4.6.5 Extração de DNA plasmidial de bactérias transformadas

4.6.5.1 Preparação das células

Uma colônia de cada bactéria transformada foi inoculada em um tubo de ensaio contendo 2 mL de meio LB acrescido com 50 µg/mL de ampicilina. Os tubos foram incubados a 37°C, sob agitação de 100 rpm, por 16 – 18h.

4.6.5.2 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial das células de *E. coli* transformadas foi realizada seguindo o protocolo descrito por Green e Sambrook (2012) com algumas modificações. Foram dispensados em microtubos 1,5 mL das culturas que foram centrifugadas a 8100 g, a 4°C, por 1 min. O meio de cultura foi removido e as células ressuspensas em 100 µL de solução de lise alcalina I (50 mM glicose, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) e o conteúdo foi vigorosamente agitado em agitador elétrico. Em seguida foi adicionado à esta suspensão 200 µL de solução de lise alcalina II (0.2 N NaOH, 1% SDS), preparada no momento do uso. O microtubo foi invertido gentilmente cinco vezes e então incubado no gelo por 5 min. Após o período de incubação foram adicionados 150 µL de solução alcalina III (60 mL acetato de potássio 5 M, 11,5 mL ácido glacial acético, 28,5 mL água destilada

estéril). A mistura foi homogeneizada e novamente incubada no gelo por 5 min. As bactérias lisadas foram centrifugadas a 8100 g, por 10 min, a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo onde foi adicionado 1 volume de isopropanol (-20°C) e a mistura foi incubada durante 30 min a temperatura ambiente. O conteúdo foi centrifugado a 8100 g, por 10 min, a 4°C e o precipitado ressuspenso em 150 µL de TE (100 mM Tris-Cl pH 8 e 10 mM EDTA pH 8). A esta suspensão foi acrescentado 10 mg/mL de RNase pancreática e incubada durante 30 min a temperatura ambiente. A purificação do DNA se deu pela adição de 1 volume de fenol – clorofórmio (1:1). A mistura da fase orgânica e aquosa foi feita em agitador elétrico e a emulsão foi centrifugada a 8100 g, por 5 min, a 4°C. A fase aquosa foi transferida para um novo microtubo onde foi adicionado 2 V de etanol. A solução foi homogeneizada em agitador magnético e incubada em temperatura ambiente por 2 min. O conteúdo foi centrifugado a 8100 g, por 5 min, a 4°C e o sobrenadante removido. O DNA foi lavado com 1 mL de álcool 70%, centrifugado a 8100 g, por 2 min, a 4°C. O DNA foi seco pela evaporação do álcool a temperatura ambiente e ressuspenso em 50 µL de TE. O DNA foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

4.6.6 Digestão com endonuclease de restrição

Para verificar se as bactérias transformadas continham o inserto clonado foram realizadas digestões com a endonuclease de restrição *EcoRI*. A digestão foi realizada em um volume final de 15 µL, contendo: 2000 ng de DNA plasmidial, 1 x tampão da enzima, 1 U *EcoRI* e água Milli-Q estéril para completar o volume. As reações foram incubadas em banho de água por 2 h, a 37°C. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% como descrito anteriormente.

4.6.7 M13 – PCR

Após a quantificação em Nano Espectrofotômetro das amostras de DNA plasmidial que continham o inserto, as mesmas foram submetidas a amplificações do DNA recombinante com os *primers* M13 (Tabela 6) (INVITROGEN, 2014). Foram preparadas reações para um volume final de 20 µL, contendo: 12,8 pmol de cada *primer*, 50 - 100 ng de DNA recombinante, 1X tampão de reação, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril para completar o volume. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador

ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido por 24 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, alongamento a 72°C por 30 segundos, e extensão final a 72°C por 7 minutos. As amplificações foram repetidas mais de uma vez para cada amostra em experimentos separados. As amplificações foram verificadas em gel de agarose 1% e enviadas para sequenciamento.

Tabela 6. Sequência de *primers* M13.

Primer	Sequência (5' → 3')
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC

4.7 Desenho de *primers* específicos

As sequências obtidas das amplificações com os *primers* URP foram analisadas utilizando o Software Geneious e os *primers* foram desenhados com o programa *Primer 3*, considerando os parâmetros de tamanho de *primer*, temperatura de anelamento e conteúdo de guanina-citosina.

4.8 PCR com *primers* específicos

As reações de PCR com os *primers* desenhados foram realizadas com DNA de todos os isolados fúngicos estudados neste trabalho e com o DNA de trigo.

4.8.1 *Primers* 6R 127F-547R – PCR

Foram preparadas reações para um volume final de 25 µL, contendo: 0,75 pmol de cada *primer*, 50 ng de DNA genômico, 1X tampão de reação, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril para completar o volume. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 57°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos. As amplificações foram repetidas mais de uma vez para cada amostra em experimentos separados.

4.8.2 *Primers* 38F 189F-648R – PCR

Foram preparadas reações para um volume final de 25 µl, contendo: 1

pmol de cada *primer*, 100 ng de DNA genômico, 1X tampão de reação, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 1 U Taq DNA polimerase e água Milli-Q estéril para completar o volume. Todas as amplificações foram realizadas em um termociclador ProFlex™ PCR System (Thermo Fisher Scientific), com um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 53°C por 45 segundos, alongamento a 72°C por 1 minuto, e extensão final a 72°C por 7 minutos. As amplificações foram repetidas mais de uma vez para cada amostra em experimentos separados.

4.8.3 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos das amplificações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Foram utilizados 1 µL de produto de PCR corados com 0,5 µL de GelRed (Quatro G) e 2 µL de Ladder 100bp (Ludwig Biotec) como marcador molecular. As corridas foram realizadas por um período de 1 h, utilizando os parâmetros de 80 volts, 80 miliampere e 80 watts. A revelação do gel foi registrada pelo gerador de imagens SmartView Pro (UVC11200–MajorScience).

5. RESULTADOS

5.1 Identificação morfológica

Quarenta e cinco isolados fúngicos, utilizados no presente trabalho, passaram pelo processo de identificação morfológica realizada através da observação das características da colônia micelial e da visualização por microscopia dos conídios.

Todos os isolados foram repicados em BDA e ao final do tempo de incubação (5 dias) foram observados os aspectos morfológicos das colônias. Após o crescimento das colônias os isolados foram submetidos ao microcultivo, em BDA, por um período de no mínimo 7 dias e no máximo 14 dias, e a morfologia dos conídios foi observada por microscopia óptica.

Os isolados que não produziram conídios quando cultivados em BDA foram repicados em outros meios nutritivos visando estimular a produção de conídios. Após o crescimento das colônias estes isolados foram submetidos a microcultivo com o mesmo meio utilizado para o seu crescimento.

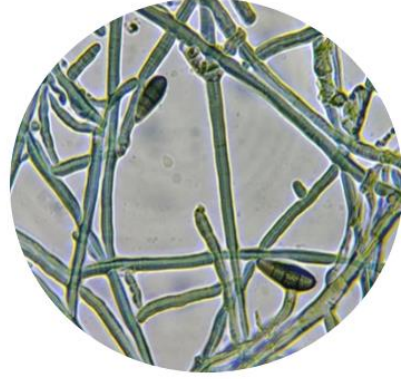
Neste tópico são feitas descrições dos caracteres morfológicos das colônias e dos conídios dos isolados fúngicos descritos na Tabela 3. As imagens das colônias miceliais e dos conídios foram geradas por uma câmera fotográfica de 16 megapixels. Os conídios foram fotografados em um aumento de 400X.

A colônia do isolado LMA323AL_1 desenvolveu hifas algodonosas de coloração acinzentada, com borda branca e circular. Estas características também foram observadas na colônia do isolado LMA323AL_3. A colônia do isolado LMA323AL_2 desenvolveu hifas algodonosas esbranquiçadas, com borda irregular. A colônia do isolado LMA323AL_4 desenvolveu hifas aveludadas escuras, com borda irregular. A colônia do isolado LMA323AL_5 desenvolveu hifas algodonosas brancas, com borda circular. Estes isolados foram submetidos a microcultivo em BDA para serem identificados morfológicamente. Os isolados LMA323AL_1, LMA323AL_2, LMA323AL_3 e LMA323AL_4 foram identificados como *Alternaria*. Estes isolados desenvolveram conídios obclavados ou ovoides, cor marrom escuro, com septos longitudinais e/ou transversais (Figura 7).

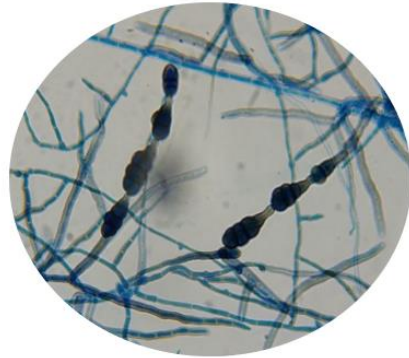
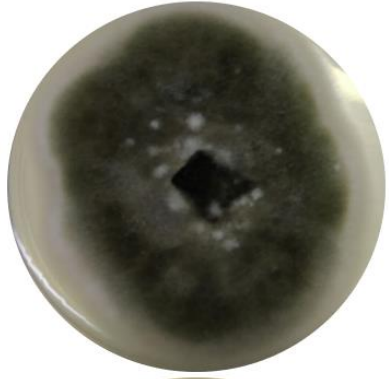
LMA323AL_1



LMA323AL_2



LMA323AL_3



LMA323AL_4

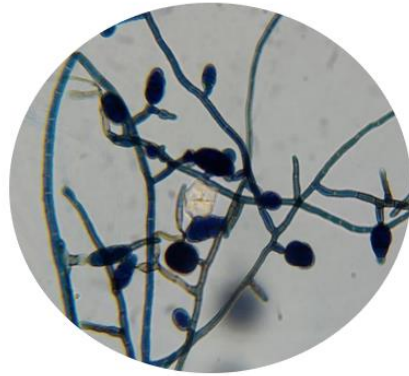




Figura 7. Características das colônias miceliais (esquerda) e dos conídios (direita) dos isolados LMA323AL_1, LMA323AL_2, LMA323AL_3, LMA323AL_4, identificados como *Alternaria*, e características da colônia micelial do isolado LMA323AL_5. Todos os isolados foram cultivados em BDA.

O isolado LMA323AL_5 não produziu conídios quando cultivado em BDA, então este isolado foi repicado em V8-BDA e em CA. Nos dois meios de cultivo o isolado desenvolveu hifas algodonosas acinzentadas, com borda circular. Nestes meios o isolado desenvolveu conídios obclavados, cor marrom claro, com septos transversais, sendo identificado como *Bipolaris*. As características morfológicas deste isolado em CA podem ser observadas na figura 8.



Figura 8. Característica da colônia micelial (esquerda) e conídios (direita), em CA, do isolado LMA323AL_5, identificado como *Bipolaris*.

Os isolados LMA323DR_27, LMA323DR_45, LMA323PY_48, LMA323DR_C1/08-5 e LMA323DR_C1/08-11 não produziram conídios em BDA e então foram cultivados em V8-BDA. As colônias dos isolados LMA323DR_27, LMA323DR_C1/08-5 e LMA323DR_C1/08-11 desenvolveram hifas rasteiras escuras, com borda branca e circular. A colônia do isolado LMA323DR_45 desenvolveu hifas algodonosas em forma de discos concêntricos acinzentados e

brancos. A colônia do isolado LMA323PY_48 desenvolveu hifas rasteiras escuras e avermelhadas, com borda branca e circular. Com exceção do isolado LMA323PY_48 que não produziu conídios, estes isolados foram identificados como *Drechslera*. Os isolados identificados desenvolveram conídios claros, cilíndricos e com septos transversais. As características descritas para alguns isolados podem ser visualizadas na figura 9.

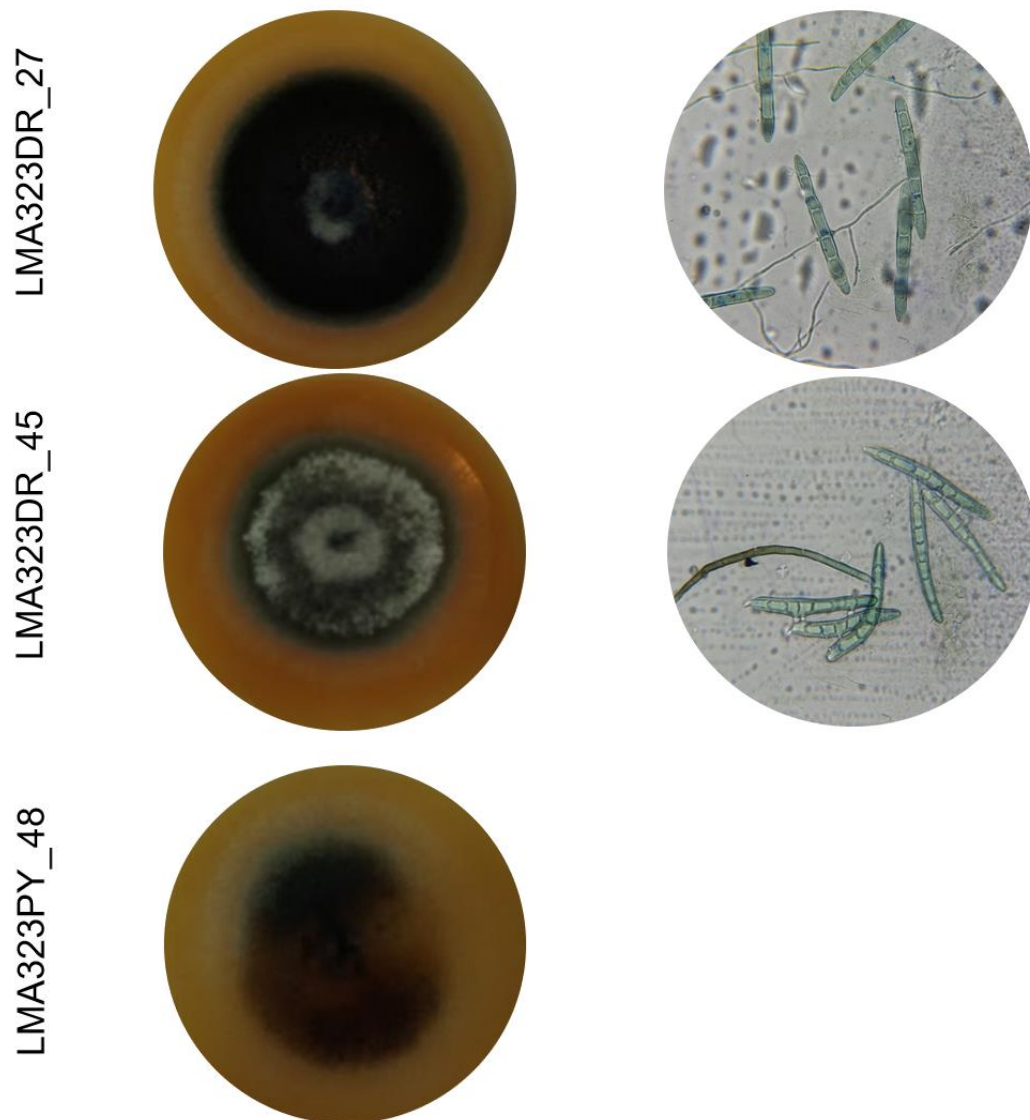


Figura 9. Característica das colônias miceliais (esquerda) e conídios (direita) dos isolados LMA323DR_27 e LMA323DR_45, identificados como *Drechslera*, e características da colônia micelial dos isolado LMA323PY_48. Todos os isolados foram cultivados em V8-BDA.

Os isolados LMA323CE_1, LMA323CE_2, LMA323BIO1, LMA323BIS98004P, LMA323BI_98041P, LMA323BISA20P, LMA323DI_1 e

LMA323SCS1 não produziram conídios em BDA e então foram cultivados em V8-BDA e em CA. Em comparação com o meio BDA foi possível observar diferenças no tamanho e forma das colônias. Alguns exemplos podem ser visualizados na figura 10. Quando submetidos a microcultivo nenhum destes isolados produziu conídios, portanto, não foram identificados morfologicamente.

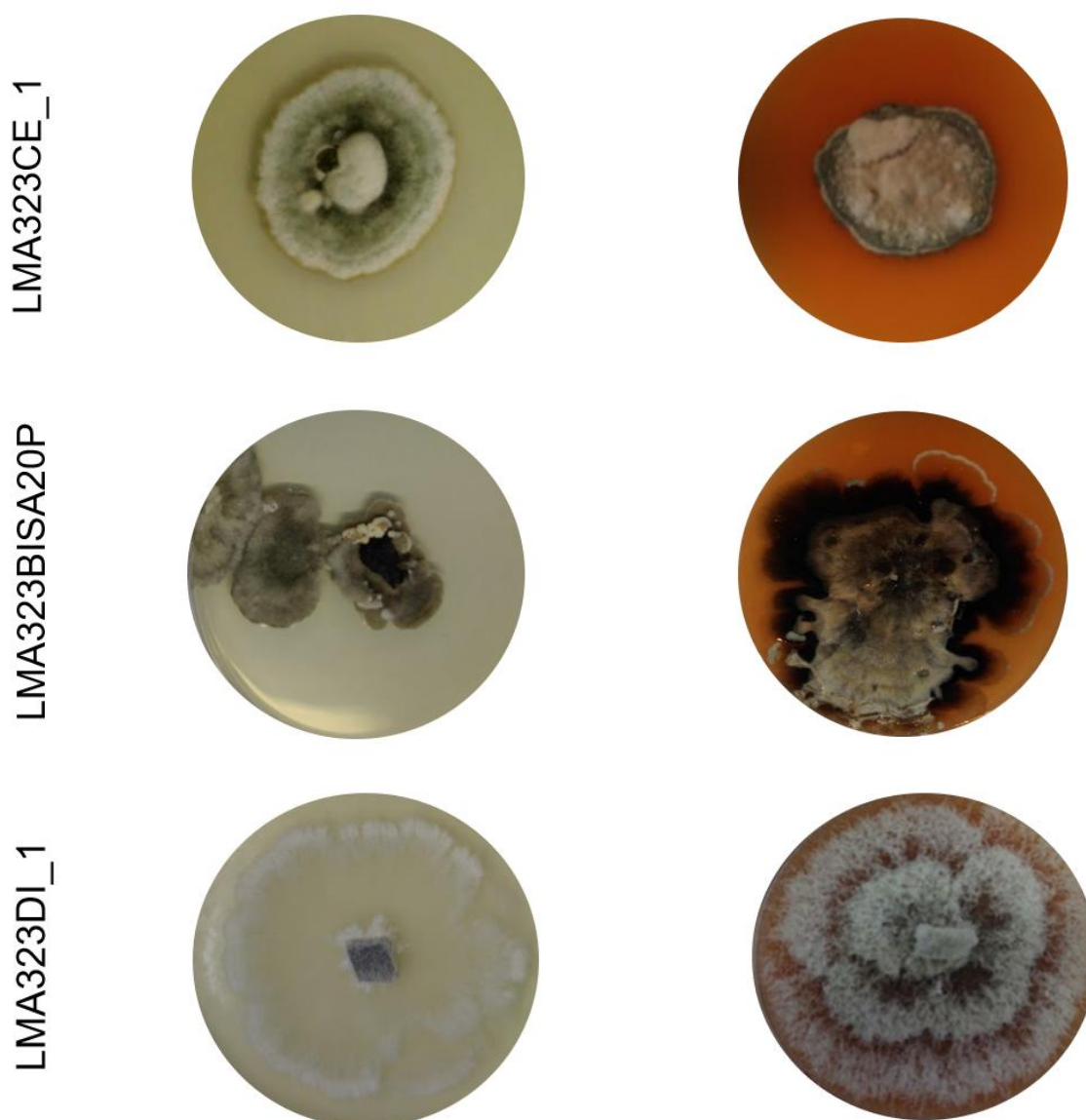


Figura 10. Colônias miceliais dos isolados LMA323CE_1, LMA323BISA20P e LMA323DI_1. Comparação entre o crescimento em BDA (esquerda) e em CA (direita).

Os isolados LMA323AS_1, LMA323AS_2, LMA323BIS1, LMA323BIS2, LMA323BI_C1/08-2, LMA323BIS903, LMA323BIS98007P, LMA323BIS98012P, LMA323BIS98028P, LMA323BIS98034P, LMA323BI_15M2P, LMA323BI_18M2P,

LMA323BI_CF0201P, LMA323EX_1, LMA323FU_1, LMA323FU_2, LMA323FU_3, LMA323FU_4, LMA323FU_09M134, LMA323GE_1, LMA323PA_1, LMA323PE_12, LMA323PE_13, LMA323RIC_1, LMA323RIP_1 e LMA323UL_1 produziram conídios nos cultivos em BDA.

As colônias dos isolados LMA323AS_1 e LMA323AS_2 desenvolveram hifas pulverulentas e escuras, com borda irregular. Estes isolados foram identificados como *Aspergillus*, através de seus conídios globosos, inchados e escuros.

A colônia do isolado LMA323EX_1 desenvolveu hifas escuras e aveludadas, com borda irregular. Este isolado foi identificado como *Exserohilum*, através de seus conídios cilíndricos, de coloração escura e com septos transversais.

As colônias dos isolados LMA323FU_1, LMA323FU_2, LMA323FU_3, LMA323FU_4 e LMA323FU_09M134 desenvolveram hifas algodonosas, rosadas e esbranquiçadas, que tomaram toda a placa. Estes isolados foram identificados como *Fusarium*, através de seus conídios hialinos, em formato de canoa, ligeiramente curvados nas pontas.

A colônia do isolado LMA323GE_1 desenvolveu hifas brancas e algodonosas, com borda circular. Este isolado foi identificado como *Gerlachia*, através de seus conídios pequenos e hialinos, curvados nas pontas, agrupados ao longo das hifas.

A colônia do isolado LMA323PA_1 desenvolveu hifas pulverulentas, com coloração amarela, que tomaram toda a placa. Este isolado foi identificado como *Paecilomyces*, através de seus conidióforos divergentes e conídios hialinos, fusóides, em cadeia basipetal.

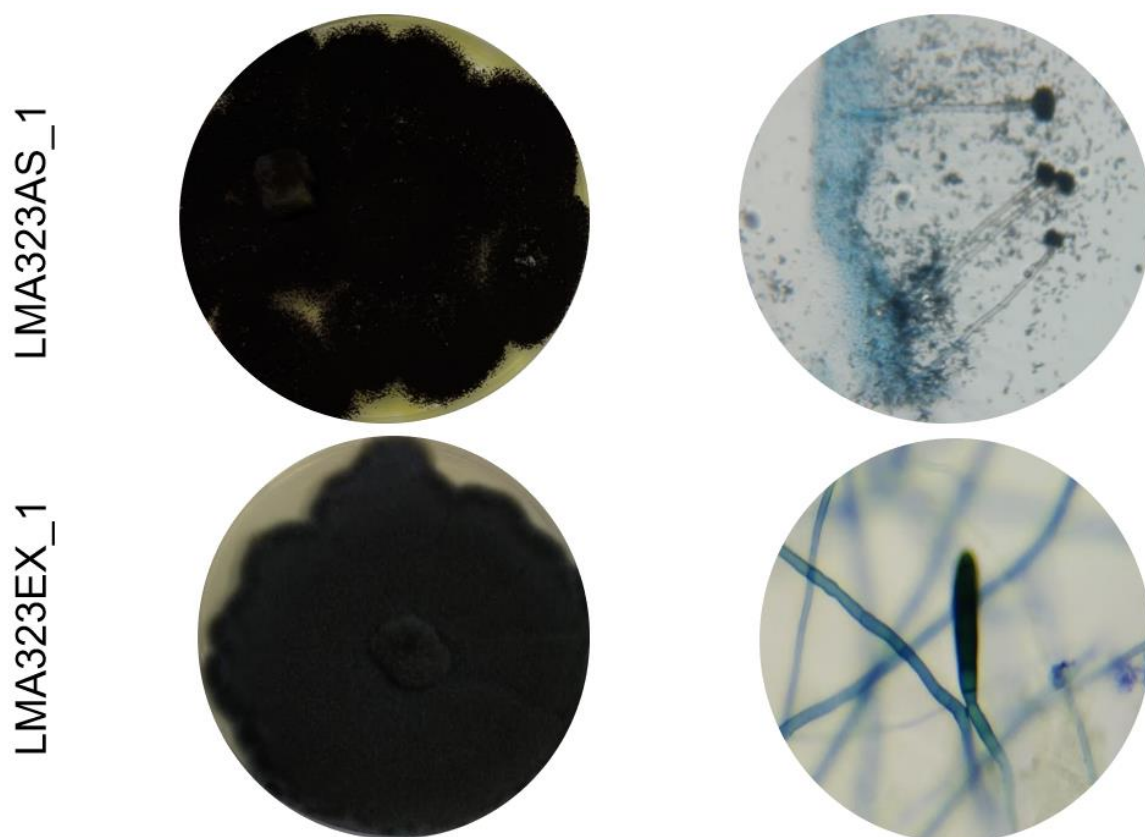
As colônias dos isolados LMA323PE_12 e LMA323PE_13 desenvolveram hifas esverdeadas e aveludadas, com borda branca e irregular. Estes isolados foram identificados como *Penicillium*, através de seus conidióforos isolados, ramificado perto do ápice, com conídios hialinos, globulosos, em cadeia basipetal.

A colônia do isolado LMA323RIC_1 desenvolveu hifas algodonosas e escuras, que tomaram toda a placa. Este isolado foi identificado como *Rhizoctonia*, através da formação de esclerócios, que são estruturas duras, formadas por uma massa de hifas compactadas.

A colônia do isolado LMA323RIP_1 desenvolveu hifas aveludadas, de coloração verde escuro no centro, tornando-se mais claras próximas a borda, branca

e irregular. Este isolado foi identificado como *Rhizopus*, através dos seus esporangiosporos.

A colônia do isolado LMA323UL_1 desenvolveu hifas algodonosas com discos concêntricos acinzentados e esbranquiçados. Este isolado foi identificado como *Ulocladium*, através de seus conídios ovoides, escuros, singulares e septados. Alguns exemplos das características descritas para cada um dos isolados podem ser observados na figura 11.



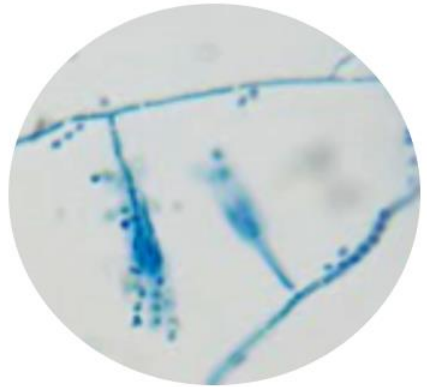
LMA323FU_3



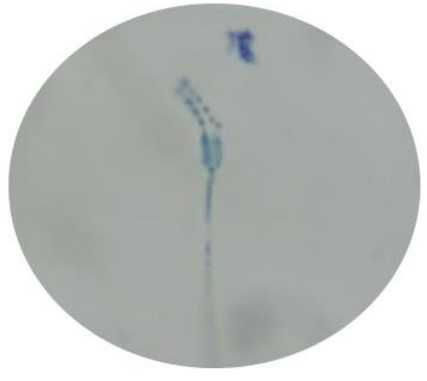
LMA323GE_1



LMA323PA_1



LMA323PE_13



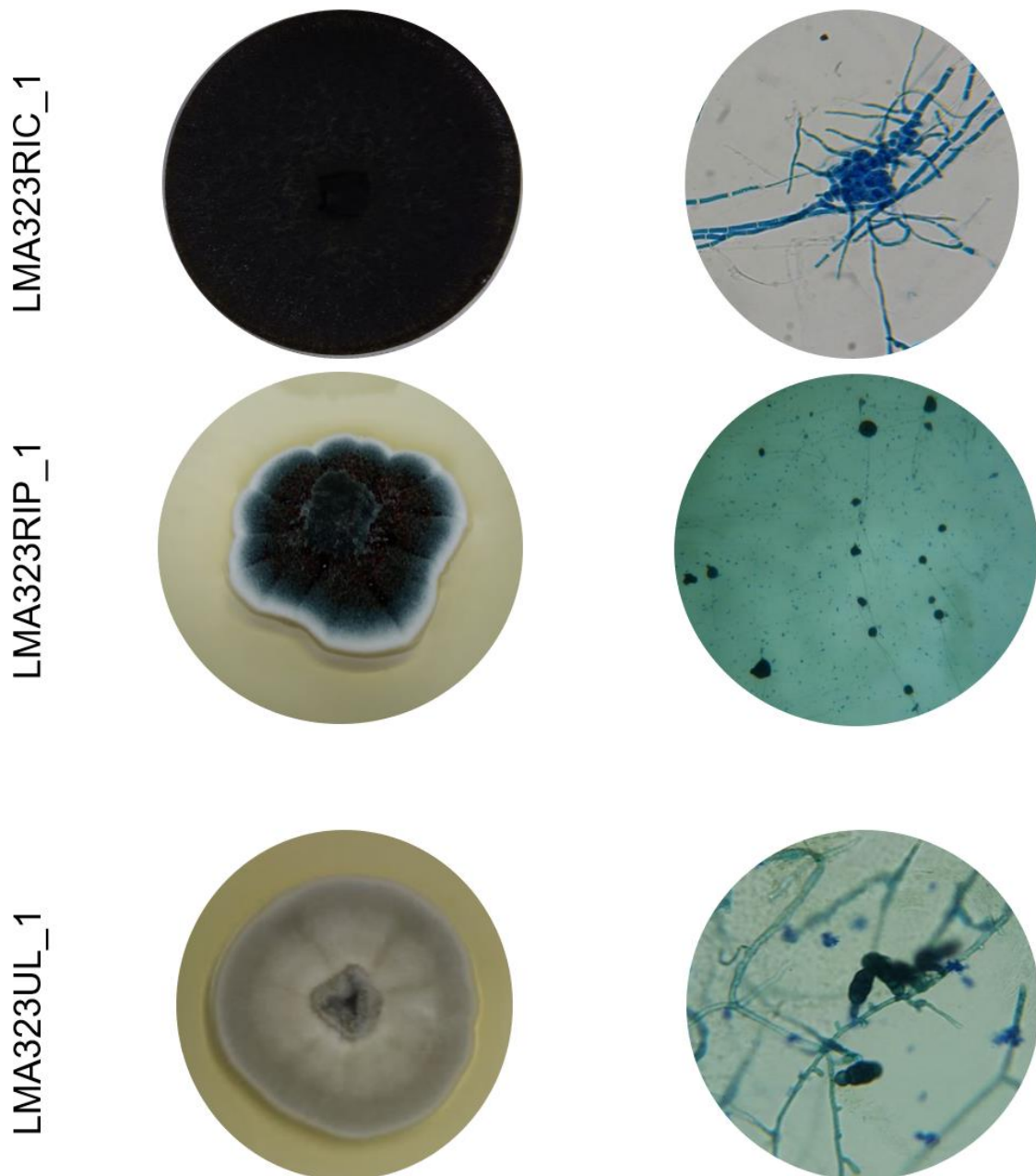
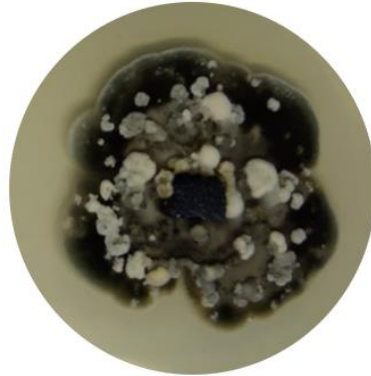
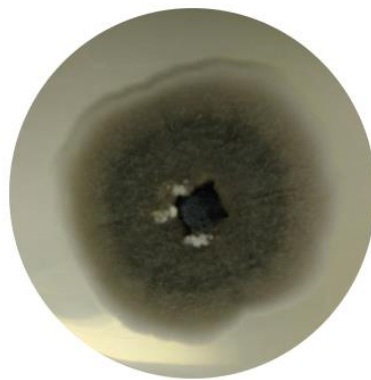


Figura 11. Característica das colônias miceliais (esquerda) e conídios (direita) dos isolados LMA323AS_1 (*Aspergillus*), LMA323EX_1 (*Exserohilum*), LMA323FU_3 (*Fusarium*), LMA323GE_1 (*Geotrichia*), LMA323PA_1 (*Paecilomyces*), LMA323PE_13 (*Penicillium*), LMA323RIC_1 (*Rhizoctonia*), LMA323RIP_1 (*Rhizopus*) e LMA323UL_1 (*Ulocladium*). Todos os isolados foram cultivados em BDA.

As colônias dos isolados LMA323BIS1, LMA323BIS98007P e LMA323BI_C1/08-2 desenvolveram hifas algodonosas e acinzentadas, com borda circular. As colônias dos isolados LMA323BIS2, LMA323BIS98012P e LMA323BIS98028P desenvolveram hifas acinzentadas escuras, com corpos

frutíferos esbranquiçados e borda irregular. As colônias dos isolados LMA323BIS98034P, LMA323BI_15M2P, LMA323BI_18M2P e LMA323BI_CF0201P desenvolveram hifas aveludadas e escuras, com borda irregular. A colônia do isolado LMA323BIS903 desenvolveu hifas aveludadas, de coloração amarela, com borda irregular. Todos estes isolados foram identificados como *Bipolaris*, através de seus conídios curvados, cor marrom escuro para dourado, com septos transversais e extremidades cônicas.

LMA323BIS98012P LMA323BIS98007P



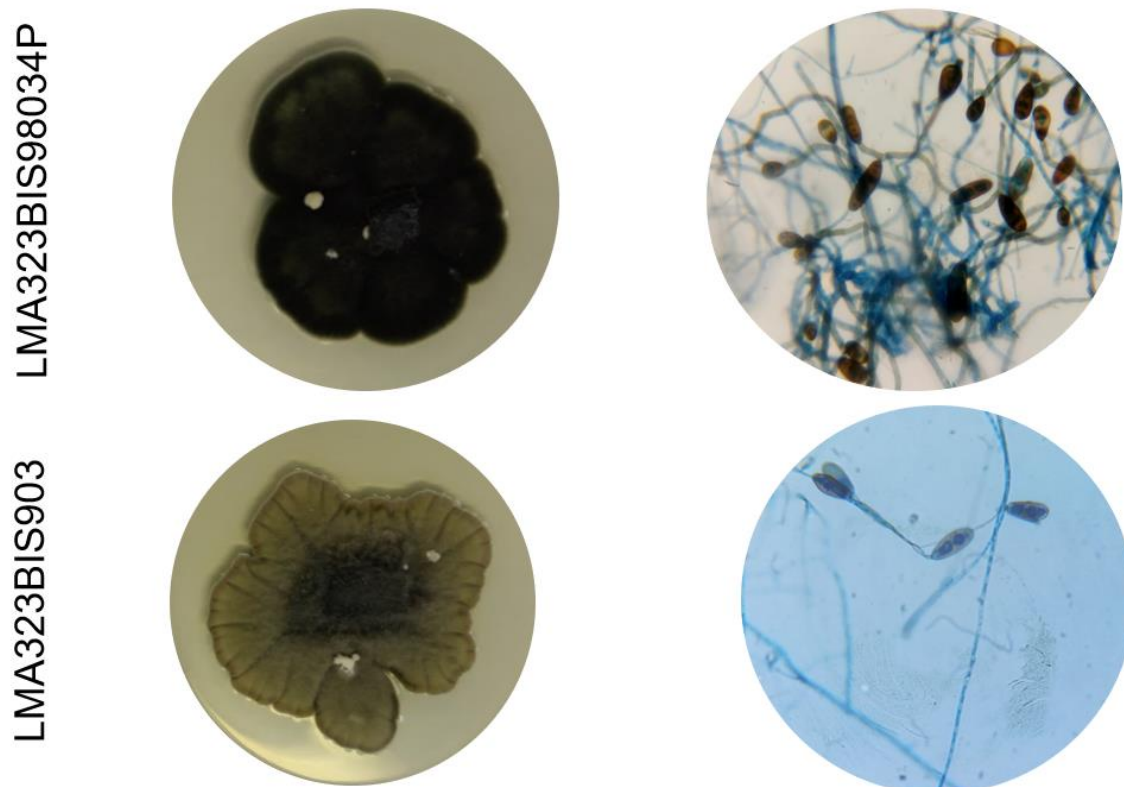


Figura 12. Característica das colônias miceliais (esquerda) e conídios (direita) dos isolados LMA323BIS98007P, LMA323BIS98012P, LMA323BIS98034P e LMA323BIS903, identificados como *Bipolaris*. Todos os isolados foram cultivados em BDA .

A colônia do isolado LMA323AS_3 desenvolveu hifas pulverulentas esverdeadas, com borda branca e irregular, quando cultivado em BDA. Este isolado produziu conídios globosos, mas não foi identificado morfologicamente por microscopia, sendo classificado como indefinido.

5.2 Identificação genotípica

Doze isolados foram identificados em nível de gênero. Os isolados LMA323AL_2 e LMA323AL_5 foram identificados como *Alternaria* sp., sendo que o isolado LMA323AL_5 foi identificado morfologicamente como *Bipolaris*. Os isolados LMA323BI_C1/08-2, LMA323BI_98041P, LMA323BI_15M2P, LMA323BI_18M2P e LMA323BI_CF0201P foram identificados como *Bipolaris* sp., análogo aos resultados da identificação morfológica. Os isolados LMA323CE_1 e LMA323CE_2 foram identificados como *Cercospora* sp., o isolado LMA323DI_1 foi identificado como

Diaporthe sp. e o isolado LMA323PY_48 foi identificado como *Pyrenophora* sp.; nenhum destes isolados foi identificado morfológicamente.

Doze isolados foram identificados em nível de espécie. Os isolados LMA323BIS1, LMA323BIS2, LMA323BIS903, LMA323BIS98007P, LMA323BIS98012P, LMA323BIS98028P, LMA32398034P foram identificados morfológicamente como *Bipolaris* e geneticamente como *Bipolaris sorokiniana*. Os isolados LMA323BIS98004P e LMA323BISA20P não foram identificados morfológicamente e também foram identificados como *Bipolaris sorokiniana*. Os isolados LMA323MAP1 e LMA323SCS1 também não foram identificados morfológicamente e foram identificados geneticamente como *Macrophomina phaseolina* e *Sclerotinia sclerotiorum*, respectivamente.

A identificação final de cada isolado foi realizada através da comparação dos resultados da identificação morfológica e da identificação genotípica. Estes resultados podem ser verificados na tabela 7.

Tabela 7: Identificação morfológica e genotípica dos isolados fúngicos fitopatogênicos

Código do isolado	Identificação morfológica	Identificação genotípica						Identificação Final
		GenBank			Mycobank			
		Identidade	Identificação	Entrada	Identidade	Identificação	Entrada	
LMA323AL_1	<i>Alternaria</i>							<i>Alternaria</i> sp.
LMA323AL_2	<i>Alternaria</i>	89%	<i>Alternaria</i> sp.	HQ821481.1	89,17%	<i>Alternaria</i> sp.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/KF193442	<i>Alternaria</i> sp.
LMA323AL_3	<i>Alternaria</i>							<i>Alternaria</i> sp.
LMA323AL_4	<i>Alternaria</i>							<i>Alternaria</i> sp.
LMA323AL_5	<i>Bipolaris</i>	100%	<i>Alternaria tenuissima</i>	MG012286.1	100%	<i>Alternaria tenuissima</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/KY788028	<i>Alternaria</i> sp.
		100%	<i>Alternaria alternata</i>	MG250610.1	100%	<i>Alternaria alternata</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/MF509752	
LMA323AS_1	<i>Aspergillus</i>							<i>Aspergillus</i> sp.
LMA323AS_2	<i>Aspergillus</i>							<i>Aspergillus</i> sp.
LMA323AS_3	<i>Indefinido</i>	100%	<i>Aspergillus versicolor</i>	KT187711.1	100%	<i>Aspergillus tennesseensis</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/KP794079	<i>Aspergillus</i> sp.
LMA323BIO1		99%	<i>Bipolaris oryzae</i>	KU715248.1	99,81%	<i>Bipolaris oryzae</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/KX834944	<i>Bipolaris oryzae</i>
LMA323BIS1	<i>Bipolaris</i>	98%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KY364632.1	98,43%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclink/KY364632	<i>Bipolaris sorokiniana</i>

LMA323BIS2	<i>Bipolaris</i>	99%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137837.1	98,43%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KY364632	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BI_C1/08-2	<i>Bipolaris</i>	99%	<i>Bipolaris</i> sp.	JF767001.1	99,80%	<i>Bipolaris</i> sp.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/JF767001	<i>Bipolaris</i> sp.
LMA323BIS903	<i>Bipolaris</i>	100%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137837.1	100%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX137834	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BIS98004P		100%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137834.1	100%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX137837	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BIS98007P	<i>Bipolaris</i>	99%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137837.1	99,41%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KF922886	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BIS98012P	<i>Bipolaris</i>		<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KF765399 B.				<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BIS98028P	<i>Bipolaris</i>	99%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137837.1	99,81%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX137834	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BIS98034P	<i>Bipolaris</i>	99%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137837.1	99,81%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX137834	<i>Bipolaris sorokiniana</i>
LMA323BI_98041P		84%	<i>Bipolaris</i> sp.	KT270286.1	84,96%	<i>Bipolaris</i> sp.	http://www.westerdijkinstitute.nl/Collections/Biologics.aspx?Link=TeRec=16193495eTableKey=1468261600000009	<i>Bipolaris</i> sp.
LMA323BISA20P		99%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	KX137838.1	98,22%	<i>Bipolaris sorokiniana</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KX137838	<i>Bipolaris sorokiniana</i>

LMA323BI_15M 2P	<i>Bipolaris</i>	90%	<i>Bipolaris</i> sp.	MK103015.1	89,431%%	<i>Bipolaris</i> sp.	http://www.westerdijkinstituut.nl/Collections/Biologics.aspx?Link=TeRec=19446eTableKey=14682616000000011	<i>Bipolaris</i> sp.
LMA323BI_18M 2P	<i>Bipolaris</i>	85%	<i>Bipolaris</i> sp.	KX137837.1	82,14%	<i>Bipolaris</i> sp.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/KC662104	<i>Bipolaris</i> sp.
LMA323BI_CF0 201P	<i>Bipolaris</i>	97%	<i>Bipolaris</i> sp.	KT270286.1	97,05%	<i>Bipolaris</i> sp.	http://www.fungalbarcoding.org/Biologics.aspx?Link=TeRec=1453eTableKey=101281100000000000	<i>Bipolaris</i> sp.
LMA323CE_1		99%	<i>Cercospora glycinicola</i>	NR147293.1	99,77%	<i>Cercospora</i> sp.	http://www.fungalbarcoding.org/Biologics.aspx?Link=TeRec=836eTableKey=101281100000000027	<i>Cercospora</i> sp.
		99%	<i>Cercospora beticola</i>	NR121315.1				
LMA323CE_2		98%	<i>Cercospora</i> sp.	MK027104.1	98,36%	<i>Cercospora</i> sp.	http://www.fungalbarcoding.org/Biologics.aspx?Link=TeRec=836eTableKey=101281100000000027	<i>Cercospora</i> sp.
LMA323DI_1		94%	<i>Diaporthe</i> sp.	NR_152472.1	96,67%	<i>Diaporthe</i> sp.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AY739826	

LMA323DR_27	<i>Drechslera</i>							<i>Drechslera</i> sp.
LMA323DR_45	<i>Drechslera</i>							<i>Drechslera</i> sp.
LMA323PY_48		87%	<i>Pyrenophora</i> sp.	AY739826.1	85,95%	<i>Pyrenophora</i> sp.	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AY739826	<i>Pyrenophora</i> sp. Anamorfo <i>Drechslera</i> sp. <i>Drechslera</i> sp.
LMA323DR_C1/ 08-5	<i>Drechslera</i>							<i>Drechslera</i> sp.
LMA323DR_C1/ 08-11	<i>Drechslera</i>							<i>Drechslera</i> sp.
LMA323EX_1	<i>Exserohilum</i>							<i>Exserohilum</i> sp.
LMA323FU_1	<i>Fusarium</i>							<i>Fusarium</i> sp.
LMA323FU_2	<i>Fusarium</i>							<i>Fusarium</i> sp.
LMA323FU_3	<i>Fusarium</i>							<i>Fusarium</i> sp.
LMA323FU_4	<i>Fusarium</i>							<i>Fusarium</i> sp.
LMA323FU_09 M134	<i>Fusarium</i>							<i>Fusarium</i> sp.
LMA323GE_1	<i>Gerlachia</i>							<i>Gerlachia</i> sp.
LMA323MAP1		100%	<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>	KT862032.1	100%	<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KT862031	<i>Macrophomina</i> <i>phaseolina</i>
LMA323PA_1	<i>Paecilomyces</i>							<i>Paecilomyces</i> sp.
LMA323PE_12	<i>Penicillium</i>							<i>Penicillium</i> sp.
LMA323PE_13	<i>Penicillium</i>							<i>Penicillium</i> sp.

5.3 Amplificação utilizando *primers* URP

O início da busca por sequências que permitissem o desenho de *primers* específicos para *Bipolaris sorokiniana* ocorreu através da amplificação do DNA genômico de alguns isolados fúngicos e do DNA de sementes de trigo com *primers* URP. Esta PCR foi utilizada para verificar a presença de fragmentos comuns apenas entre os isolados de *B. sorokiniana* amplificados pelos *primers* URP 6R e URP 38F.

5.3.1 Perfil de amplificação com *primer* URP 6R

O perfil de amplificação com o *primer* URP 6R pode ser observado na figura 13. A amplificação com este *primer* gerou fragmentos comuns para o gênero *Bipolaris* com aproximadamente 1300pb. Estes fragmentos não estão presentes ou não apresentam a mesma intensidade para as amostras dos isolados fúngicos identificados como *Cercospora* sp. (LMA323CE_2), *Alternaria* sp. (LMA323AL_5), *B. oryzae* (LMA323BIO1), *Drechslera* sp. (LMA323DR_27, LMA323DR_45, LMA323PY_48, LMA323DR_C1/08-5 e LMA323DR_C1/08-11), *Exserohilum* sp. (LMA323EX_1) e para a amostra de semente de trigo.

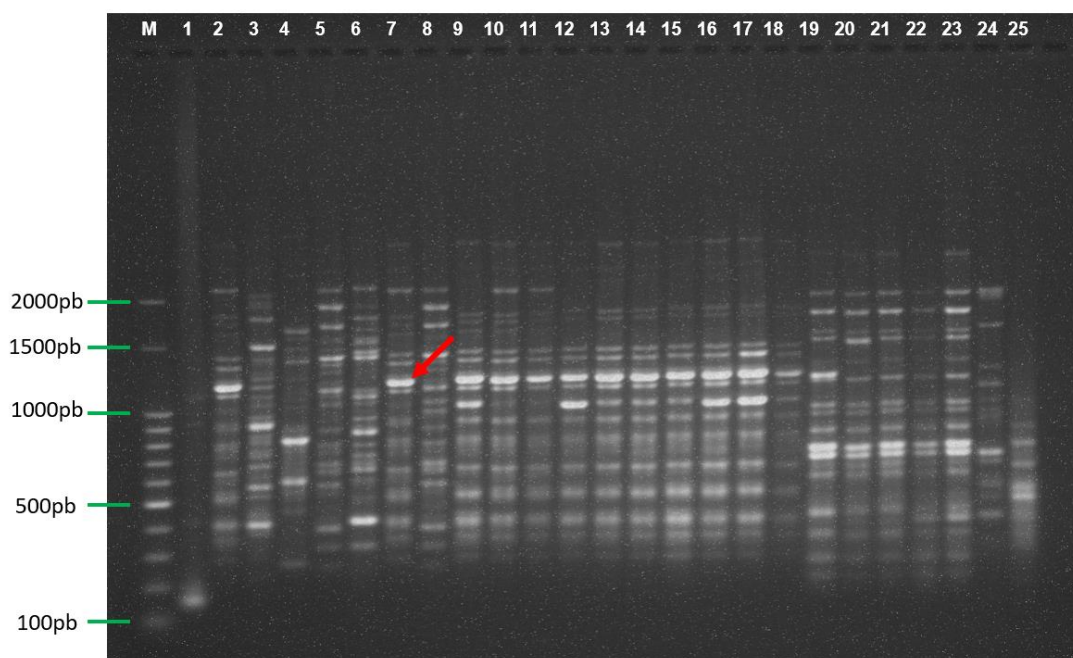


Figura 13. Amplificação com *primer* URP 6R de DNA de isolados fúngicos e DNA de trigo observados em gel de agarose 1,5%. (M) Ladder 100bp; (1) controle negativo; (2) controle positivo para *Bipolaris sorokiniana* – isolado LMA323BIS98007P; (3) *Cercospora* sp. (LMA323CE_2); (4) *Alternaria* sp. (LMA323AL_5); (5) *B. sorokiniana* (LMA323BIS1); (6) *B. oryzae* (LMA323BIO1); (7) *B. sorokiniana* (LMA323BIS2); (8) *Bipolaris* sp.

(LMA323BI_C1/08-2); (9) *B. sorokiniana* (LMA323903); (10) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98004P); (11) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98012P); (12) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98028P); (13) *B. sorokiniana* (LMABIS98034P); (14) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98041P); (15) *B. sorokiniana* (LMA323BISA20P); (16) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_15M2P); (17) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_18M2P); (18) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_CF0201P); (19) *Drechslera* sp. (LMA323DR_27); (20) *Drechslera* sp. (LMA323DR_45); (21) *Drechslera* sp. (LMA323PY_48); (22) *Drechslera* sp. (LMA323DR_C1/08-5); (23) *Drechslera* sp. (LMA323DR_C1/08-11); (25) *Exserohilum* sp. (LMA323EX_1) e (25) Trigo. A seta em vermelho indica a posição dos fragmentos de 1300pb gerados pelo *primer* URP 6R.

5.3.2 Perfil de amplificação com *primer* URP 38F

O perfil de amplificação com o *primer* URP 38F pode ser observado na figura 14. A amplificação com este *primer* gerou fragmentos comuns com aproximadamente 490pb, 700pb e 1300pb. Estes fragmentos também não estão presentes ou não apresentam a mesma intensidade para as amostras dos isolados fúngicos identificados como *Cercospora* sp. (LMA323CE_2), *Alternaria* sp. (LMA323AL_5), *B. oryzae* (LMA323BIO1), *Drechslera* sp. (LMA323DR_27, LMA323DR_45, LMA323PY_48, LMA323DR_C1/08-5 e LMA323DR_C1/08-11), *Exserohilum* sp. (LMA323EX_1) e para a amostra de sementes de de trigo.

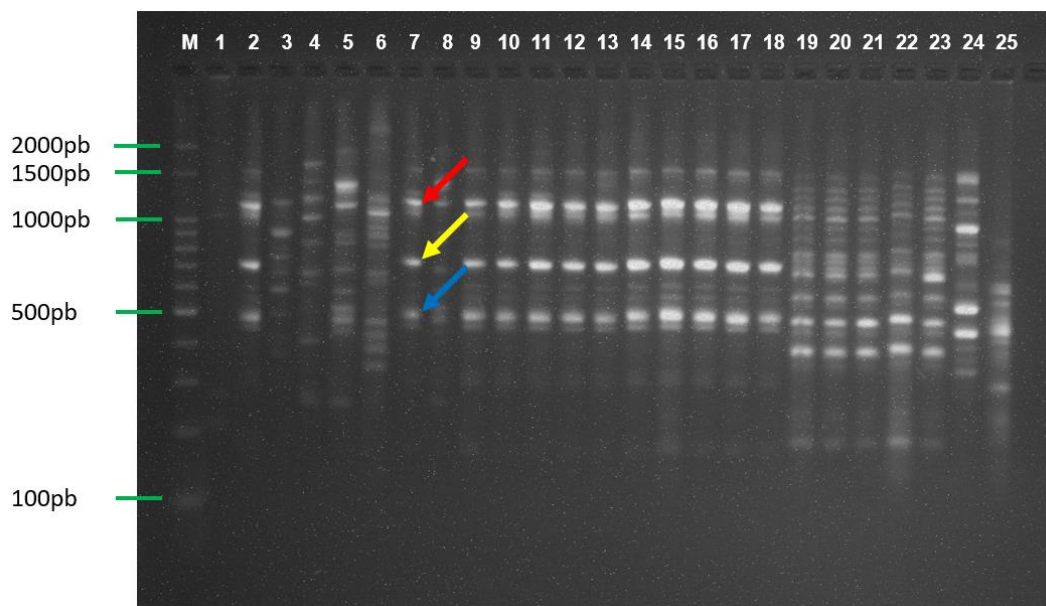


Figura 14. Amplificação com *primer* URP 38F de DNA de isolados fúngicos e DNA de trigo observados em gel de agarose 1,5%. (M) Ladder 100bp; (1) controle negativo; (2) controle positivo para *Bipolaris sorokiniana* – isolado LMA323BIS98007P; (3) *Cercospora* sp. (LMA323CE_2); (4) *Alternaria* sp. (LMA323AL_5); (5) *B. sorokiniana* (LMA323BIS1); (6) *B. oryzae* (LMA323BIO1); (7) *B. sorokiniana* (LMA323BIS2); (8) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_C1/08-2); (9) *B. sorokiniana* (LMA323BIS903); (10) *B. sorokiniana*

(LMA323BIS98004P); (11) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98012P); (12) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98028P); (13) *B. sorokiniana* (LMABIS98034P); (14) *B. sorokiniana* (LMA323BIS98041P); (15) *B. sorokiniana* (LMA323BISA20P); (16) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_15M2P); (17) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_18M2P); (18) *Bipolaris* sp. (LMA323BI_CF0201P); (19) *Drechslera* sp. (LMA323DR_27); (20) *Drechslera* sp. (LMA323DR_45); (21) *Drechslera* sp. (LMA323PY_48); (22) *Drechslera* sp. (LMA323DR_C1/08-5); (23) *Drechslera* sp. (LMA323DR_C1/08-11); (25) *Exserohilum* sp. (LMA323EX_1) e (25) Trigo. A seta em vermelho indica a posição dos fragmentos de 1300pb, a seta em amarelo indica a posição dos fragmentos de 700pb e a seta em azul indica a posição dos fragmentos de 490pb, respectivamente.

5.4 Obtenção das sequências para desenho dos *primers* específicos.

O DNA isolado LMA323BIS2, identificado como *Bipolaris sorokiniana*, amplificado com os *primers* URP, foi utilizado como base para o desenho dos *primers* específicos. O fragmento de 1300pb, gerado com o *primer* URP 6R, e o fragmento de 700pb, gerado com o *primer* URP 38F, foram extraídos de um gel de agarose 1,5%, para serem clonados, utilizando o vetor de clonagem pCR[®]2.1-TOPO[®] e células de *E. coli* DH5 α competentes.

O processo de clonagem resultou em seis colônias de *E. coli* transformadas, três delas com a amostra do *primer* URP 6R, denominadas 6R1, 6R4 e 6R5 e três com a amostra do *primer* URP 38F, denominada 38F1, 38F2 e 38F3. O DNA plasmidial de cada uma das colônias foi extraído e então digerido com a enzima *EcoRI* para verificar a presença do inserto. Uma vez confirmada a presença do inserto o DNA plasmidial das colônias 6R1, 6R4, 6R5, 38F1 e 38F2 foi amplificado com os *primers* M13 *forward* e M13 *reverse*. Os produtos das amplificações foram enviados para sequenciamento e as sequências geradas foram analisadas utilizando o *software* Geneious.

Os *primers* específicos foram desenhados com base nas sequências dos insertos das colônias 6R1, 6R4, 6R5, 38F1 e 38F2, utilizando o programa *Primer 3*. Os *primers* foram desenhados para conter em sua composição 40% a 60% de guanina – citosina e não formar dímeros.

A partir das sequências dos insertos das colônias 6R1, 6R4 e 6R5 foram desenhados dois pares de *primers*, denominados 6R 126F-547R e 6R 127F-547R. De acordo com o programa estes pares possibilitam a geração de fragmentos de 422pb e 421pb, respectivamente. Já a partir das sequências dos insertos das colônias 38F1 e 38F2 foram desenhados mais pares de *primers*

em comparação com as amostras anteriores, contudo, só um par respeitou os requisitos mencionados acima, sendo este denominado 38F 189F-648R, gerado a partir da colônia 38F2. De acordo com o programa este par possibilita a geração de um fragmento de 459pb. A sequência de cada *primer* está descrita na tabela 8.

Tabela 8. Sequências dos *primers* desenhados para *B. sorokiniana*.

<i>Primer</i>	Sequência
6R 126F	ACTCCAGCAACACCCATGAG
6R 127F	CTCCAGCAACACCCATGAGT
6R 547R	AGGAACAGAAGATTGCGCCA
38F 189F	TCTGCATGACTCCAACGCTT
38F 648R	ACACCCACTCACACGGTTTT

As sequências dos DNAs plasmidiais das colônias 6R1, 6R4, 6R5 e 38F2 podem ser visualizadas nas figuras 15, 16, 17 e 18, respectivamente. Os *primers* específicos desenhados com base nestas sequências estão marcados em cada amostra.

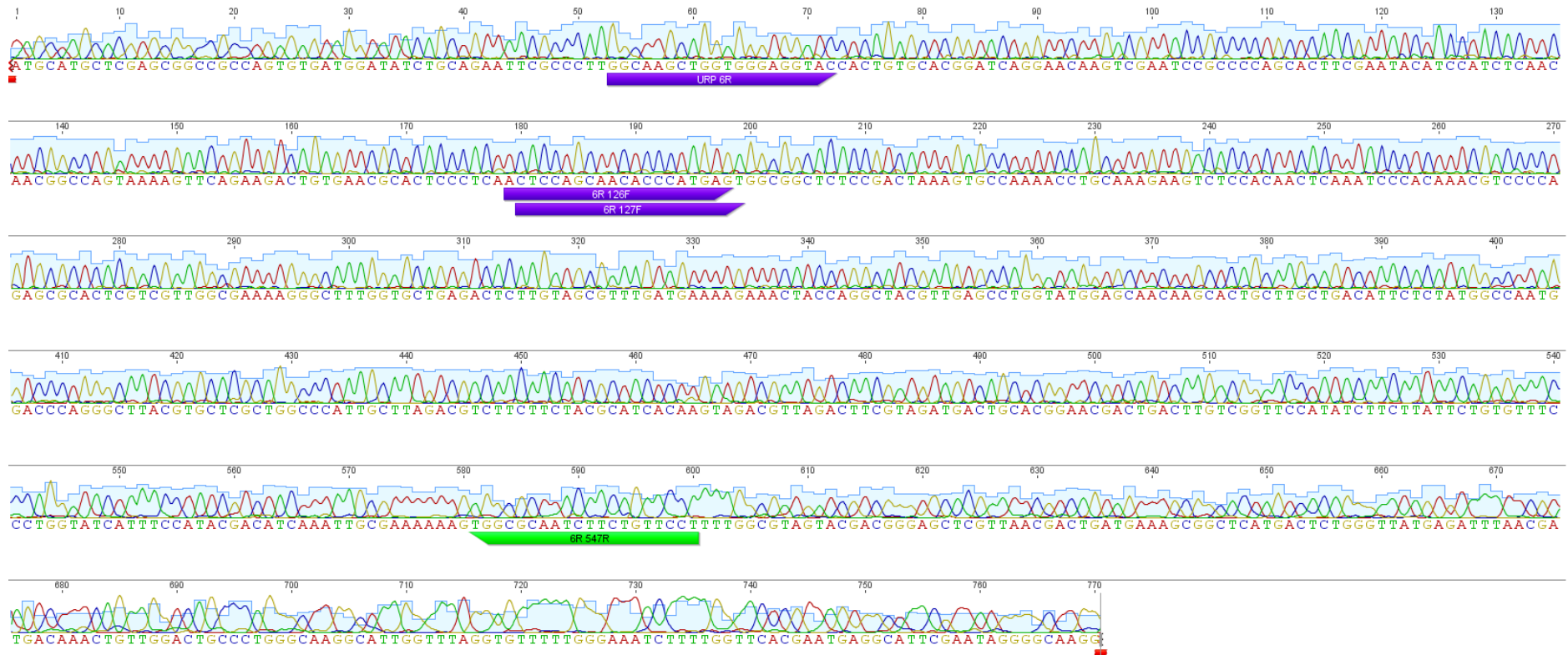


Figura 15. Sequência do DNA plasmidial da colônia 6R1. Os *primers* URP 6R, 6R 126F e 6R 127F estão marcados em roxo e o *primer* 6R 547R está marcado em verde. Esta imagem foi gerada pelo programa *Primer 3*.

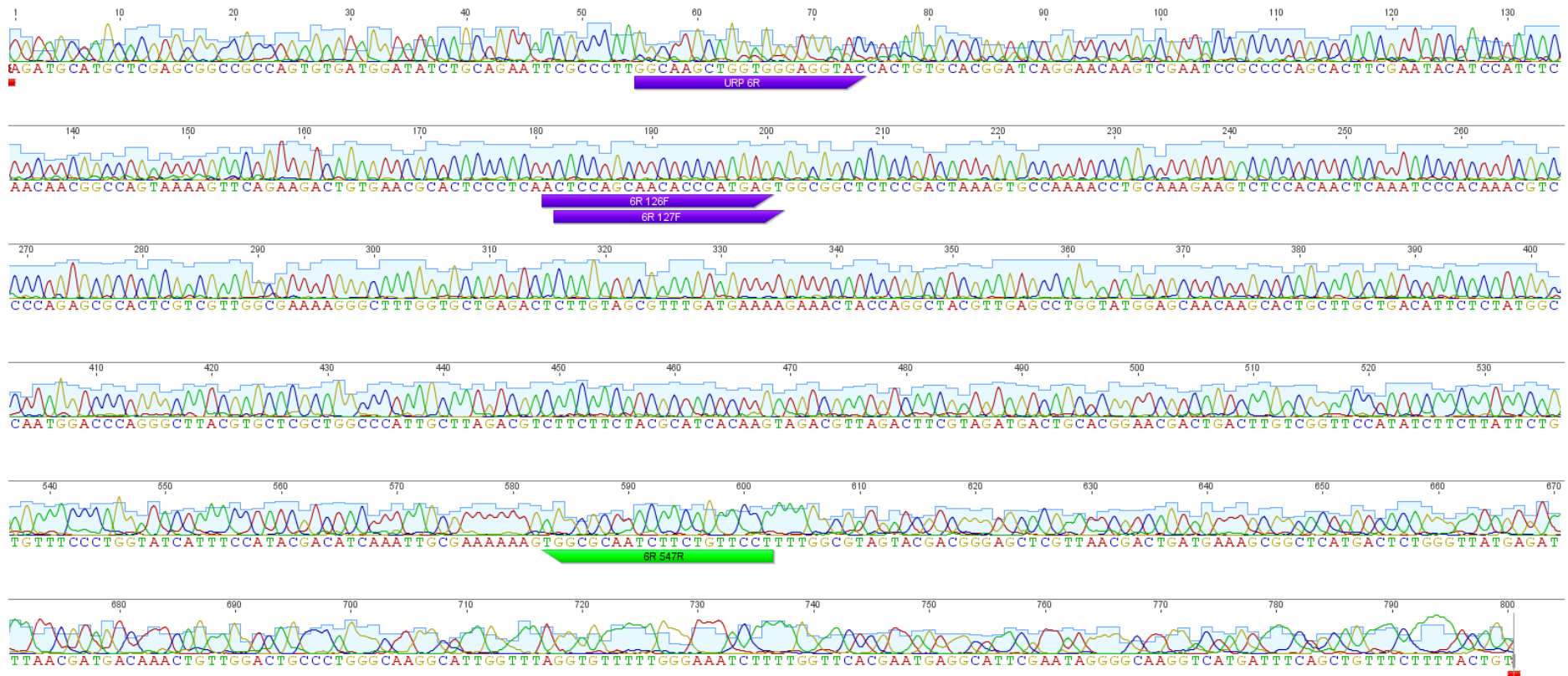


Figura 16. Sequência do DNA plasmidial da colônia 6R4. Os *primers* URP 6R, 6R 126F e 6R 127F estão marcados em roxo e o *primer* 6R 547R está marcado em verde. Esta imagem foi gerada pelo programa *Primer 3*.

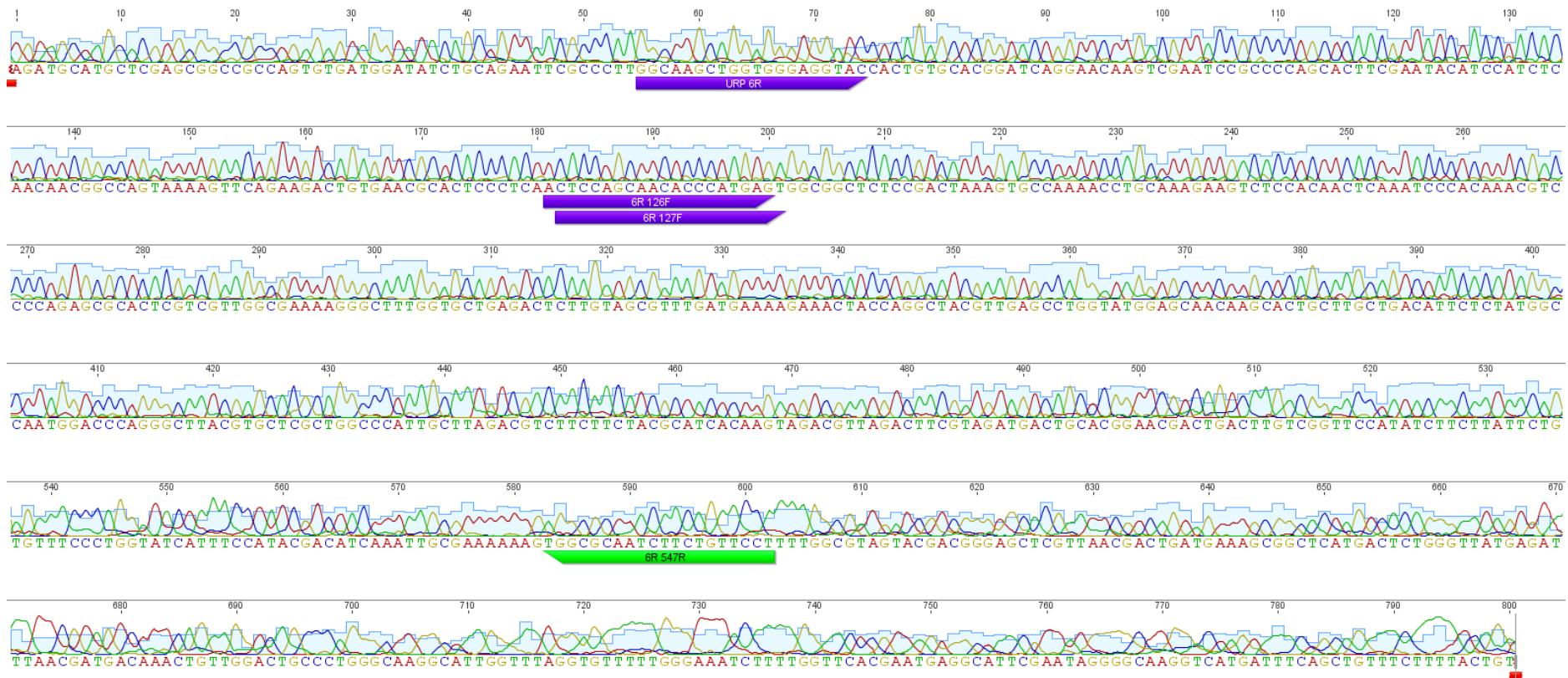


Figura 17. Sequência do DNA plasmidial da colônia 6R5. Os *primers* URP 6R, 6R 126F e 6R 127F estão marcados em roxo e o *primer* 6R 547R está marcado em verde. Esta imagem foi gerada pelo programa *Primer 3*.

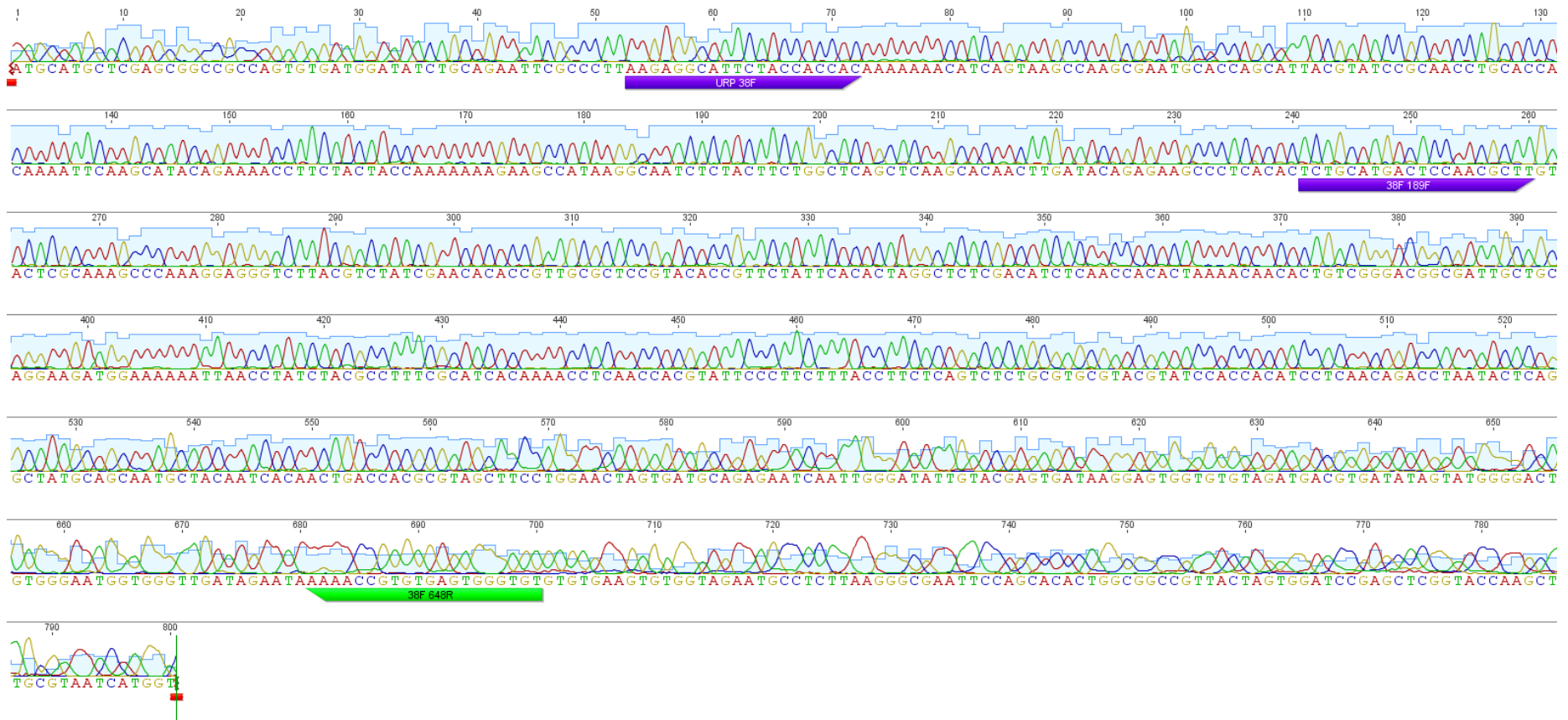


Figura 18. Sequência do DNA plasmidial da colônia 38F2. Os *primers* URP 38F e 38F 189F estão marcados em roxo e o *primer* 38F 648R está marcado em verde. Esta imagem foi gerada pelo programa *Primer 3*.

5.5 Amplificação com *primers* específicos

Durante os ensaios para determinar as melhores condições de amplificação para cada par de *primers* o par 6R 126F–547R amplificou o DNA da amostra LMA323SCS1, identificada como *Sclerotinia sclerotiorum*, em todas as temperaturas de anelamento e concentrações de *primer* testadas.

O par de *primers* 6R 127F-547R amplificou o DNA de 12 isolados fúngicos gerando fragmentos com aproximadamente 550pb. Este par amplificou os fragmentos dos isolados LMA323BIS2, LMA323BIS903, LMA323BIS98004P, LMA323BIS98007, LMA323BIS98012P, LMA323BIS98028P, LMA323BIS98034P, LMA323BISA20P, LMA323BI_98041P, LMA323BI_15M2P, LMA323BI_18M2P e LMA323BI_CF0201P, identificados como *Bipolaris sorokiniana* e *Bipolaris* sp. Este par de *primers* não amplificou os DNAs dos isolados fúngicos de outros gêneros, o DNA das sementes de trigo e o DNA da amostra LMA323BIO, identificada como *Bipolaris oryzae*. Os fragmentos produzidos por estes *primers* pode ser visualizado na figura 19.

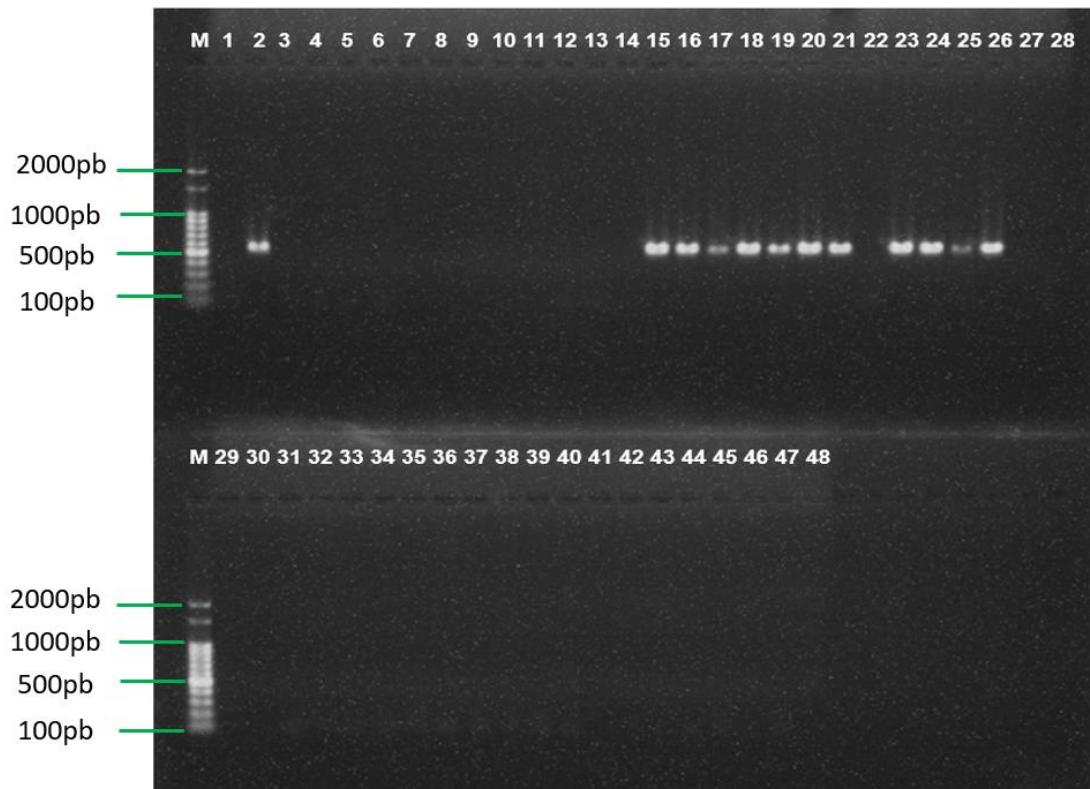


Figura 19. Amplificações com *primers* 6R 127F–547R observadas em gel de agarose 1%. (M) Ladder 100bp; (1) controle negativo; (2) controle positivo para *Bipolaris sorokiniana* – isolado LMA323BIS2; (3 a 7) *Alternaria* sp.; (8 a 10) *Aspergillus* sp. (11 e 12) *Cercospora* sp.; (13) *B. oryzae*; (14 a 21) *B. sorokiniana*; (22 a 27) *Bipolaris* sp.; (28) *Drechslera* sp.; (M) Ladder 100pb; (29 a 31) *Drechslera*

sp.; (32) *Exserohilum* sp.; (33 a 37) *Fusarium* sp. (38) *Gerlachia* sp.; (39) *Macrophomina phaseolina*; (40) *Paecilomyces* sp.; (41 e 42) *Penicillium* sp.; (43) *Diaporthe* sp.; (44) *Rhizoctonia* sp.; (45) *Rhizopus* sp.; (46) *Sclerotinia sclerotiorum*; (47) *Ulocladium* sp. e (48) trigo.

O par de *primers* 38F 189F-648R amplificou o DNA de 7 isolados fúngicos gerando fragmentos com aproximadamente 650pb. Este par amplificou os fragmentos dos isolados LMA323BIS2, LMA323BIS903, LMA323BIS98004P, LMA323BIS98007, LMA323BIS98012P, LMA323BIS98034P, identificados como *Bipolaris sorokiniana* e LMA323BI_18M2P, identificado como *Bipolaris* sp. Este par de *primers* também não amplificou os DNAs dos isolados fúngicos de outros gêneros, o DNA das sementes de trigo e o DNA da amostra LMA323BIO1, *B. oryzae*. Os fragmentos gerados por estes *primers* podem ser visualizado na figura 20.

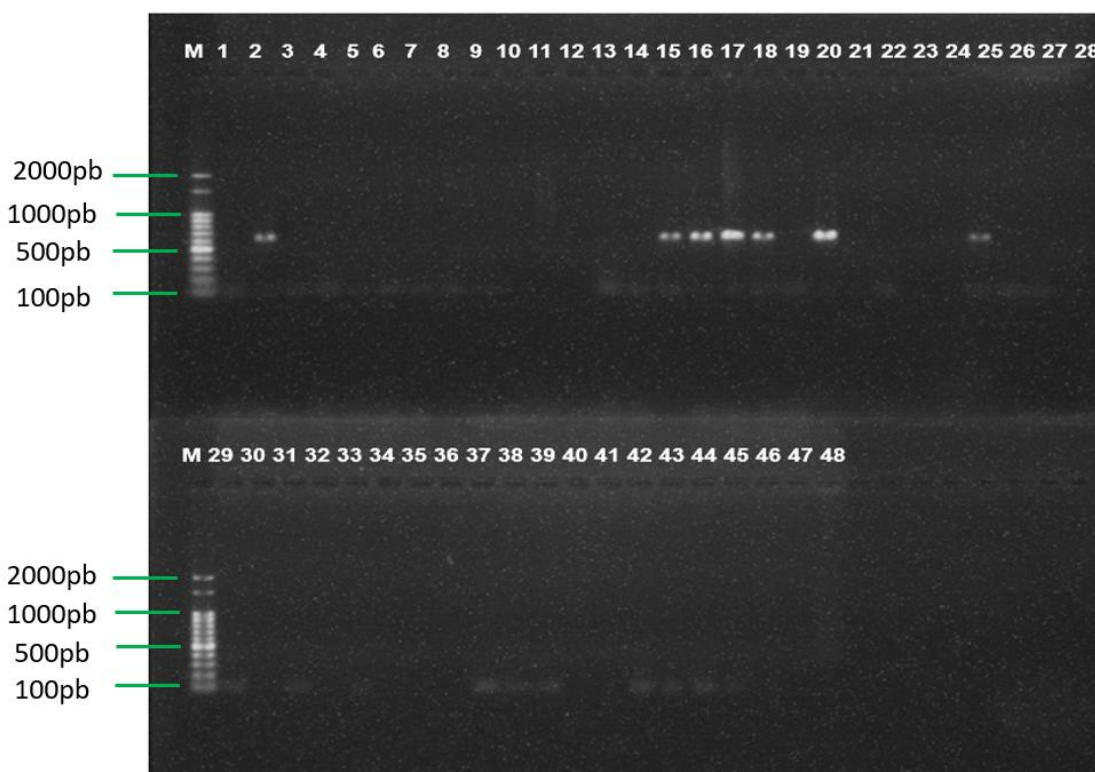


Figura 20. Amplificações com *primers* 38F 189F – 648R observadas em gel de agarose 1%. (M) Ladder 100bp; (1) controle negativo; (2) controle positivo para *Bipolaris sorokiniana* – isolado LMA323BIS2; (3 a 7) *Alternaria* sp.; (8 a 10) *Aspergillus* sp. (11 e 12) *Cercospora* sp.; (13) *B. oryzae*; (14 a 21) *B. sorokiniana*; (22 a 27) *Bipolaris* sp.; (28) *Drechslera* sp.; (M) Ladder 100bp; (29 a 31) *Drechslera* sp.; (32) *Exserohilum* sp.; (33 a 37) *Fusarium* sp. (38) *Gerlachia* sp.; (39) *Macrophomina phaseolina*; (40) *Paecilomyces* sp.; (41 e 42) *Penicillium* sp.; (43) *Diaporthe* sp.; (44) *Rhizoctonia* sp.; (45) *Rhizopus* sp.; (46) *Sclerotinia sclerotiorum*; (47) *Ulocladium* sp. e (48) trigo.

Os resultados indicam que os pares 6R 127F-547R e 38F 189F-648R podem ser utilizados para distinguir isolados do gênero *Bipolaris* de isolados dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Drechslera*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Gerlachia*, *Macrophomina*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* e *Ulocladium*, bem como a espécie *Bipolaris sorokiniana* da espécie *Bipolaris oryzae*. Os resultados também indicam que o par 6R 127F-547R foi mais eficiente na detecção dos isolados de *Bipolaris sorokiniana* que o par 38F 189F-648R.

6. DISCUSSÃO

De acordo com Pires (2017) o plantio de trigo em sistemas de rotação de culturas é fundamental para a sustentabilidade da economia brasileira. O seu plantio entre as safras de culturas importantes, como da soja e do milho, contribui na conservação do solo, evitando sua erosão, sua compactação e a lixiviação de nutrientes por enxurradas e também auxilia no controle de doenças e pragas na lavoura. Do ponto de vista econômico, mantém a movimentação de maquinários e mão de obra durante as estações mais frias do ano.

Do mesmo modo que o clima úmido da região sul do Brasil permite a plantação do trigo durante o ano inteiro (PIRES, 2017) ele propicia o desenvolvimento de fungos fitopatogênicos (BERNARDI et al., 2018). As doenças causadas por estes fungos representam uma ameaça à saúde das plantas e dos animais (CAIRNS et al., 2016; RESENDE; VEKIC, 2018) e também podem levar à redução na produtividade das lavouras e por consequência a grandes perdas econômicas (ASLAM et al., 2017; FAO; IPPC, 2018; RESENDE; VEKIC, 2018).

Além das perdas econômicas causadas por estes fungos eles podem ser responsáveis por importantes perdas da biodiversidade, pois quando são disseminados para uma nova área podem competir com espécies nativas (FAO; IPPC, 2018). O monitoramento da saúde das plantas e a detecção precoce do patógeno são essenciais para reduzir a disseminação das doenças causadas por fungos fitopatogênicos e também para facilitar práticas eficazes de manejo (AGGARWAL et al., 2011; ASLAM et al., 2017; FAO; IPPC, 2018).

O formato de diagnóstico para doenças causadas por fungos fitopatogênicos envolve a interpretação de sintomas visuais seguidos de identificação laboratorial do fungo associado, utilizando meios seletivos e microscopia para a sua confirmação. Estes métodos convencionais são demorados e requerem uma pessoa qualificada e especializada para realizá-los. O uso de técnicas moleculares para diagnosticar doenças em plantas pode resultar uma análise mais rápida, sensível e precisa, pois enquanto o diagnóstico por morfologia baseia-se em caracteres fenotípicos o diagnóstico molecular é baseado em caracteres genotípicos (AGGARWAL et al., 2011; ASLAM et al., 2017; CAIRNS et al., 2016).

Em contraste com os métodos convencionais o uso de técnicas

moleculares pode permitir a detecção do fungo fitopatogênico sem precisar do isolamento e cultivo em laboratório ou até mesmo em estágios do ciclo de vida onde ele não é detectável pela identificação morfológica, o que pode levar a melhorias nas estratégias de manejo dos fungos e facilitar o acompanhamento da saúde das plantas (ASLAM et al., 2017; CAIRNS et al., 2016).

A observação das características morfológicas das colônias miceliais e dos conídios dos isolados fúngicos, utilizados no presente trabalho, foi realizada através do cultivo destes isolados nos meios BDA, V8-BDA e CA. Dos quarenta e seis isolados fúngicos trinta e seis foram identificados morfológicamente, nove não produziram conídios, impossibilitando a identificação morfológica e um não foi submetido a identificação morfológica.

O cultivo em meio BDA incentivou a produção de conídios permitindo a identificação morfológica de trinta e dois isolados fúngicos dos gêneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Bipolaris*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Gerlachia*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rizoctonia*, *Rizopus* e *Ulocladium*. De acordo com PULZ e MASSOLA (2009) o meio BDA é comumente utilizado para o cultivo e esporulação de várias espécies de fungos, tal como foi observado neste trabalho.

Santos et al. (2016) alcançaram bons resultados para esporulação de *Bipolaris maydis* em meio BDA e Manamgoda et al. (2014) relataram esporulação abundante em meio BDA para o fungo *Bipolaris sorokiniana* após uma semana de cultivo, resultados que acordam com o que foi observado durante a identificação morfológica dos isolados identificados como *Bipolaris*. De quatorze isolados, onze foram identificados quando cultivados em meio BDA.

Sabe-se que muitos fungos utilizam glicose como fonte de carbono, contudo, outros açúcares podem ser aproveitados para induzir a produção de esporos (DUARTE; NUNES; ALBUQUERQUE, 1982; MOSCHEN, 2008; PENARIOL; MONTEIRO; PITELLI, 2008; PULZ; MASSOLA, 2009; SANTOS et al., 2016; SILVA; DOIHARA, 2003). Por este motivo, neste trabalho foram utilizados os meios V8-BDA e CA como alternativa ao meio BDA.

Pulz e Massola (2009) compararam a produção de esporos em diferentes meios de cultura para fungos do gênero *Alternaria* e relataram produção superior utilizando o meio V8-ágar em comparação com o meio BDA. O suco V8 é composto pelos sucos concentrados de tomate, cenoura, aipo, beterraba, salsinha, alface, agrião e espinafre, conferindo uma diversidade de nutrientes que podem ser

utilizados para o crescimento dos fungos. Este suco também contém em sua composição vitamina C e de acordo com Penariol, Monteiro e Pitelli (2008) a adição de vitaminas em meios de cultivos podem favorecer a produção de conídios.

Os isolados LMA323DR_27, LMA323DR_45, LMA323DR_C1/08-5 e LMA323DR_C1/08-11, que não foram identificados morfológicamente quando cultivados em meio BDA, desenvolveram colônias miceliais e conídios característicos quando cultivados em meio V8-BDA. Este meio permitiu a identificação destes quatro isolados como fungos do gênero *Drecheslera*. Moschen (2008) testou em seu trabalho meios contendo o suco V8 e seus resultados apontaram que tanto o meio V8-ágar quanto o meio V8-BDA proporcionaram melhor esporulação para *Pyrenophora tritici-repentis* quando comparados ao meio BDA, o que também pode ser observado neste trabalho.

SANTOS et al. (2016) relataram que o meio de cultivo em que o fungo é inoculado pode interferir no aspecto das colônias o que condiz com as alterações nas características morfológicas das colônias miceliais observadas quando os isolados foram inoculados nos meios BDA, V8-BDA e CA.

Duarte, Nunes e Albuquerque (1982) relataram que o meio CA favoreceu o crescimento radial do micélio de *Colletotrichum corchorum* porém não favoreceu sua esporulação. Este comportamento pôde ser observado para os oito isolados inoculados neste meio, que não desenvolveram conídios.

Silva e Doihara (2003) compararam resultados de produção de esporos com a inoculação de *Phytophthora palmivora* nos meios V8-ágar, CA e BDA e sobre frutos de mamão. A produção de esporos no fruto foi estatisticamente superior a produção nos meios testados, sugerindo a importância de substratos naturais na esporulação deste patógeno. Manamgoda et al. (2014) também utilizaram substratos naturais de folhas de milho para induzir a esporulação em isolados de *Bipolaris*. A necessidade nutricional de substratos naturais pode ser um dos fatores que não favoreceu a esporulação dos nove isolados não identificados morfológicamente.

A etapa de esporulação dos isolados fúngicos e a padronização das condições ideais constitui uma das principais dificuldades, principalmente quando a produção de esporos é necessária em altas concentrações. Para induzir a produção de esporos podem-se utilizar outros procedimentos durante a incubação do fungo (MOSCHEN, 2008; PENARIOL; MONTEIRO; PITELLI, 2008; SANTOS et al., 2016; SILVA; DOIHARA, 2003).

Santos et al. (2016) indica que a luz exerce efeito direto sobre a produção de esporos. A luminosidade pode inibir ou induzir a esporulação do fungo e a falta dela pode ter afetado a produção dos esporos destes nove isolados não identificados. Além da composição dos meio de cultura e exposição a luz, a temperatura de incubação, o pH do meio de cultura e a injúria das colônias através da fricção mecânica são fatores relacionados a produção de esporos (DUARTE; NUNES; ALBUQUERQUE, 1982; PENARIOL; MONTEIRO; PITELLI, 2008; PULZ; MASSOLA, 2009; SANTOS et al., 2016; SILVA; DOIHARA, 2003).

Convencionalmente a identificação de fungos é feita apenas pela observação das características morfológicas (AGGARWAL et al., 2011; ASLAM et al., 2017; RAJA et al., 2017). De acordo com RAJA et al. (2017) por mais que esta metodologia seja importante para acompanhar a evolução das características fenotípicas, ela pode não ser adequada para a classificação em nível de espécie, isto porque para algumas fungos os caracteres morfológicos podem ser problemáticos, até para microbiologistas treinados.

Sendo assim, para dar continuidade ao processo de identificação laboratorial, os isolados não identificados por microscopia óptica e os isolados de fungos identificados em nível de gênero como *Bipolaris* foram enviados para sequenciamento da região ITS1, 5.8S, ITS2.

O marcador ITS é considerada *barcoding* para a identificação genômica de fungos (ASLAM et al., 2017; RAJA et al., 2017). Esta região é muito utilizada pois está em rápido e constante desenvolvimento, entretanto, os valores de cortes empregados para determinar espécies ainda estão sendo estudados e não há um valor único para ser aplicado para todos os grupos (RAJA et al., 2017). Dos vinte e quatro isolados enviados para sequenciamento doze foram identificados em nível de espécie e doze foram identificados em nível de gênero, obedecendo os valores de identidade $\geq 98\%$ para espécie e $\geq 80\%$ para gênero entre as sequências dos isolados e as sequências depositadas nos bancos de dados.

O uso do marcador ITS permitiu a identificação das espécies *Sclerotinia sclerotiorum*, *Macrophomina phaseolina*, *Bipolaris oryzae* e *Bipolaris sorokiniana*. Alguns isolados de *Bipolaris* entretanto não foram identificados em nível de espécie e na comparação entre os resultados de cada banco de dados houve divergências para os isolados LMA323AS_3 (identificado com 100% de identidade como *Aspergillus versicolor* através do GenBank e com 100% de identidade como

Aspergillus tennesseensis através do MycoBank) e LMA323CE_1 (identificado com 99% de identidade como *Cercospora glycinicola* através do GenBank e com 99,77% de identidade como *Cercospora* sp. através do MycoBank). Quando a região utilizada não permite a identificação da espécie pode-se utilizar outras regiões de forma complementar ou alternativa. Manamgoda et al. (2014) alcançaram bons resultados utilizando a região ITS para identificar isolados fúngicos do gênero *Bipolaris* mas determinaram que o marcador GPDH (*partial glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) é preferível para a identificação deste gênero.

O uso da região ITS não é eficiente para a identificação de fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Trichoderma*, por exemplo, uma vez que para estes fungos essa região não possui uma boa taxa de *barcoding gaps* (RAJA et al., 2017). Neste trabalho foram identificados morfologicamente isolados de *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* e a sua identificação genotípica, assim como para aqueles isolados em que a identificação genotípica não foi possível, pode ser realizada através do sequenciamento das regiões gênicas RPB1 (maior subunidade da RNA polimerase), RPB2 (segunda maior subunidade), *tub2/BenA* (beta-tubulina), 18S (menor subunidade do RNA ribossomal), 28S (maior subunidade), entre outras (ASLAM et al., 2017; RAJA et al., 2017).

Os fungos são um grupo extremamente diversificado e como tal não possuem apenas um modo de identificação. Eles podem ser identificados pela morfologia, pelo sequenciamento de regiões conservadas ou ambos (AGGARWAL et al., 2011; MANAMGODA et al., 2014; RAJA et al., 2017). Entretanto, as duas formas de identificação apresentam falhas, tanto pela necessidade de um alto conhecimento das características morfológicas quando pela credibilidade das sequências que compõem os bancos de dados, que por muitas vezes não possuem referência de publicação (ASLAM et al., 2017; RAJA et al., 2017).

Com o intuito de facilitar o diagnóstico, tornando-o mais rápido e preciso, e também de contribuir para a complementação de análises de identificação do fungo *Bipolaris sorokiniana*, iniciou-se a busca por uma sequência que pudesse ser utilizada para este fim. Para tanto, buscou-se por meio de ferramentas moleculares uma característica comum, para isolados de diferentes regiões do país e do mundo, que pudesse ser utilizada para construir *primers* específicos para esta espécie.

As técnicas baseadas na amplificação do DNA podem ser aplicadas para

o desenvolvimento de *primers* específicos para a detecção de microrganismos (AGGARWAL et al., 2011; ASLAM et al., 2017). Hong et al. (1999) utilizaram o sequenciamento da região ITS para desenvolver *primers* para a detecção do grupo *Phytophthora* e *Phytophthora cryptogea*-*P. drechsleri*. Kwon, Myung e Go (2000) utilizaram o sequenciamento das regiões 16S – 23S rRNA para desenvolver *primers* para a detecção de *Pectobacterium chrysanthemi*. No entanto Aggarwal et al. (2011) relatam que os isolados de *B. sorokiniana* testados por eles apresentaram homologia de seqüências de 98% entre si e de 90% entre outras espécies de *Bipolaris* para as regiões ITS1 e ITS2, o que pode dificultar o desenvolvimento de um *primer* específico para espécie baseado em seqüências geradas por estas região.

A amplificação do DNA utilizando *primers* universais do arroz, URP-PCR, é uma ferramenta molecular que pode ser utilizada para estudar a diversidade do genoma de procariotos e eucariotos. Esta técnica tem potencial para ser aplicada em estudos de taxonomia, filogenia e *screening* genético de populações em níveis intra e interespecíficos. Foi demonstrado que esta técnica é capaz de produzir fragmentos que são específicos de espécies ou de linhagens e que podem ser retirados do gel de agarose, clonados ou re-amplificados, fornecendo uma estratégia para o desenvolvimento de *primers* específicos para detectar espécies microbianas (KANG et al., 2002). Esta técnica foi utilizada para desenhar *primers* para *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (KANG et al., 1998 apud KANG, et al. 2002) e *B. sorokiniana* (AGGARWAL et al., 2011).

Mann et al. (2014) utilizaram URP-PCR para estudar a diversidade entre isolados de *B. sorokiniana*. Eles observaram em seu estudo a amplificação de fragmentos comuns utilizando *primers* URP para 60 isolados monospóricos. Os *primers* URP 6R e UPR 38F amplificaram fragmentos comuns para 81% e 71% dos isolados, respectivamente. No presente trabalho estes dois *primers* foram utilizados na busca por fragmentos comuns para isolados polispóricos de *B. sorokiniana*.

Através da amplificação de isolados fúngicos de diferentes gêneros e espécies utilizando *primers* URP observaram-se perfis de amplificação com fragmentos comuns e intensos para os isolados de *Bipolaris* que diferiram de peso molecular e/ou intensidade para os isolados dos outros gêneros. O perfil de amplificação utilizando o *primer* URP 6R para os isolados polispóricos de *Bipolaris* gerou fragmentos monomórficos com aproximadamente 1300pb, diferentemente do trabalho de Mann et al. (2014) onde foram gerados fragmentos monomórficos para

isolados monospóricos na faixa de 548pb. Já para a amplificação com o *primer* URP 38F foram gerados fragmentos monomórficos interessantes para a base do desenho de *primers* com peso molecular de aproximadamente 700pb, mesma faixa de amplificação relatada pelos autores citados anteriormente. Os fragmentos de 1300pb e 700pb do isolado LMA323BIS2 gerados através das ampliações com os *primers* URP 6R e 38F foram excisados do gel, purificados e clonados. O processo de clonagem resultou em cinco clones com inserto, três gerados com os fragmentos amplificados pelo *primer* URP 6R (6R1, 6R4 e 6R5) e dois pelo *primer* URP 38F (38F1 e 38F2).

Durante o processo de desenho dos *primers* específicos pode-se observar que as sequências dos clones 6R1, 6R4 e 6R5 são similares. Os *primers* desenhados para cada uma destas sequências, através do programa *Primer 3*, são iguais ou com poucas diferenças. Baseados nos parâmetros de conteúdo de guanina-citosina e formação de dímeros dois pares de *primers*, com apenas um nucleotídeo de diferença, foram escolhidos para serem testados. Estes pares foram denominados 6R 126F-547R e 6R127F-547R.

Para cada sequência dos clones 38F1 e 38F2 foram gerados *primers* diferentes, o que pode indicar a presença de mais de um fragmento que possui o mesmo peso molecular, geradas através da amplificação com o *primer* URP 38F. Para a sequência do clone 38F2 foi escolhido apenas um par de *primers* (38F 189F – 648R) por ser o único, em uma análise *in silico*, a não formar dímeros.

Aggarwal et al. (2011) relataram em seu estudo que as sequências originadas através da clonagem de um fragmento de 650pb gerado pela amplificação com o *primer* URP 1F eram todas idênticas, entretanto os isolados de *B. sorokiniana* utilizados em seu estudo eram monospóricos, diferente dos isolados utilizados no presente trabalho, que são polispóricos. Variações morfológicas entre culturas de *B. sorokiniana* monospóricas e polispóricas e entre culturas polispóricas foram observadas por POLONI et al. (2008) e neste trabalho foram observadas variações genéticas entre isolados polispóricos deste fungo.

No decorrer dos ensaios para determinar as melhores condições de amplificação para cada par de *primers* o par 6R 126F–547R amplificou o DNA da amostra LMA323SCS1, identificada por sequenciamento da região ITS como *Sclerotinia sclerotiorum* em todas as temperaturas de anelamento e concentrações de *primer* testadas, sendo assim esse par de *primers* foi considerado inespecífico

para o fungo *B. sorokiniana*.

O par de *primers* 6R 127F–547R amplificou o DNA de doze isolados, oito identificados como *B. sorokiniana* e quatro identificados como *Bipolaris* sp. O par de *primers* 38F 189F–648R amplificou o DNA de sete isolados, seis identificados como *B. sorokiniana* e um identificado como *Bipolaris* sp.

A diferença entre o número de isolados que cada par de *primers* amplificou pode estar relacionada a quantidade das sequências utilizadas para a construções dos *primers*. O par 6R 127F–547R foi construído baseado em três sequências similares amplificando seis isolados a mais que o par 38F 189F–648R que foi construído baseado apenas em uma sequência.

Os dados gerados por análises utilizando DNA são considerados mais confiáveis para a detecção de patógenos em populações mistas e a capacidade de detectar o fungo *B. sorokiniana* dentro de uma população complexa é uma das questões mais importantes para o desenho de um *primer* específico para esta espécie (AGGARWAL et al., 2011).

Para aprofundar as análises e chegar a resultados mais conclusivos é necessário sequenciar os fragmentos amplificados pelos pares de *primers* 6R 127F-547R e 38F 189F-648R, testar os *primers* com amostras de DNA de outras espécies de *Bipolaris* e também com amostras de DNA de sementes infectadas, que são uma importante fonte de inóculo para o estabelecimento de focos iniciais da doença, para assim aferir o emprego destes *primers* como uma técnica rápida e confiável, que traga benefícios e auxilie nos processos de combate da disseminação de *B. sorokiniana* como ferramentas para a detecção deste fungo.

7. CONCLUSÕES

- Os isolados fúngicos fitopatogênicos utilizados no presente trabalho foram identificados. Os isolados passaram pelo processo de identificação morfológica, que requereu tempo e conhecimento sobre os aspectos das colônias miceliais e conídios. Alguns isolados também passaram pelo processo de identificação genotípica que requereu conhecimento sobre as técnicas de biologia molecular e interpretação de dados. Concluiu-se que as duas metodologias podem interagir de forma complementar para tornar os resultados da identificação mais precisos e confiáveis.
- A amplificação do DNA dos isolados fúngicos utilizando *primers* universais do arroz, URP-PCR, pode ser utilizada como ferramenta molecular no estudo dos seus genomas. Através da amplificação com os *primers* URP 6R e 38F foram encontrados fragmentos comuns para os isolados do gênero *Bipolaris* e da espécie *Bipolaris sorokiniana*.
- Com base no estudo das sequências dos fragmentos monomórficos gerados pelas amplificações com os *primers* URP foram desenhados *primers* para o fungo *Bipolaris sorokiniana*.
- Com base nos testes realizados até o momento pode-se afirmar que os pares 6R127F-547R e 38F 189F-648R não amplificam o DNA das sementes de trigo, podem ser utilizados para distinguir isolados de *Bipolaris* de isolados de *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cercospora*, *Drechslera*, *Exserohilum*, *Fusarium*, *Gerlachia*, *Macrophomina*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Diaporthe*, *Rhizoctonia*, *Rhizopus*, *Sclerotinia* e *Ulocladium* e também podem ser utilizados para distinguir as espécies de *Bipolaris sorokiniana* de *Bipolaris oryzae*. Desta forma, os dois pares de *primers* têm potencial para serem utilizados na identificação e na detecção do fungo *Bipolaris sorokiniana*.

8. REFERÊNCIAS

- ABITRIGO – Associação Brasileira das Indústrias de Trigo. **Conhecimento**. 2018^a. Disponível em: < <http://www.abitrigo.com.br/conhecimento.php>>. Acesso em: 27 dez. 2018.
- ABITRIGO – Associação Brasileira das Indústrias de Trigo. **Estatísticas (Exportação de trigo 2018)**. 2018b. Disponível em: < <http://www.abitrigo.com.br/estatisticas-importacao-exportacao.php> >. Acesso em: 30 jan. 2019.
- Aggarwal R, Gupta S, Banerjee S, Sing VB. 2011. Development of a SCAR marker for detection of *Bipolaris sorokiniana* causing spot blotch of wheat. Canadian Journal of Microbiology. 57(11):934-942.
- Arkowitz RA, Bassilana M. 2015. Regulation of hyphal morphogenesis by Ras and Rho small GTPases. Fungal Biology Reviews. 29(1):7-19.
- Ashktorab H, Cohen RJ. 1992. Facile isolation of genomic DNA from filamentosos fungi. BioTechniques. 13(2):198-200.
- Aslam S, Tahir A, Aslam MF, Alam MW, Shedayi AA, Sadia S. 2017. Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. Journal of Plant Interactions. 12(1):493-504.
- Bacaltchuck B, Chaves MS, Lima MIPM, Costamilan LM, Maciel JLN, Salvadori JR, Gambatto A. **Características e cuidados com algumas doenças do trigo**. 2006. Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do64.htm >. Acesso em: 4 nov 2018.
- Benevides JA, Marinho G. 2015. Degradação de Pesticidas por Fungos – Uma revisão. Holos. 2:110-129.
- Bernardi CMG, Resende DO, Albuquerque ACS, Tibola C. **Cartilha do agricultor (Micotoxinas no Trigo)**. 2018. Disponível em: < www.abitrigo.com.br/cloud/cartilha_do_agricultor_micotoxinas.pdf%0D >. Acesso em: 4 nov. 2018.
- Bonato ALV. **Extração de DNA genômico de cereais de inverno na Embrapa Trigo**. Passo Fungo, Embrapa Trigo: 2008. Disponível em: < http://www.cnto.embrapa.br/biblio/co/p_co235.thm >. Acesso em: 26 jun. 2018.
- Cairns TC, Studholme DJ, Talbot NJ, Haynes K. 2016. New and Improved Techniques for the Study of Pathogenic Fungi. Trends in Microbiology. 24(1):35-50.
- Duarte MLR, Nunes AML, Albuquerque FC. **Influência de meios de cultura, pH e do regime luminoso no crescimento e esporulação de *Colletotrichum***

corchorum Ikata & Tana. Belém, Embrapa CPATU: 1982. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/382300/influencia-de-meios-de-cultura-ph-e-do-regime-luminoso-no-crescimento-e-esporulacao-de-colletotrichum-corchorum-ikata--tana> >. Acesso em: 8 dez. 2018.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **O trigo**. 2006. Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/do/p_do74_2.htm >. Acesso em: 29 dez. 2018.

FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations, IPCC – International Plant Protection Convention. **Championing an International Year of Plant Health**. Viale delle Terme di Caracalla: 2018. Disponível em: < <https://www.flfrevista.pt/2018/12/2020-vai-ser-o-ano-internacional-da-fitossanidade/> >. Acesso em: 9 jan. 2019.

Feldens L. 2018. **O homem, a agricultura e a história**. Lageado: Editora Univates.

Fernandes JMC. **Podridão comum das raízes de trigo**. 2013. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-imagens/-/midia/1015001/podridao-comum-das-raizes-de-trigo> >. Acesso em: 9 jan. 2018.

Fernandes JM, Picinini EC. Controlando as doenças do trigo na hora certa. 1999. Disponível em: < http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_co22.htm >. Acesso em: 29 dez. 2018.

González-fernández R, Prats E, Jorrín-novo JV. 2010. Proteomics of plant pathogenic fungi. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010:1-36.

Green MR, Sambrook J. 2012. **Molecular Cloning. A laboratory manual**. 4 ed. New York: Col Spring Harbor.

Guia alimentar para a população Brasileira. 2014. Disponível em: < bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf%0A%0A >. Acesso em: 9 jan. 2019.

Höfling JF, Gonçalves RB. 2008. **Microscopia de luz em microbiologia. Morfologia bacteriana e fúngica**. Porto Alegre: Artmed.

Hong S-B, Park I-C, Go S-J, Ryu J-C. 1999. Detection of Genus *Phytophthora* and *Phytophthora cyptogea*-*P. drechsleri* Complex Group Using Polymerase Chain Reaction with Sapecific Primers. *The Plant Pathology*. 15(5):287-294.

Invitrogen. **TOPO® TA Cloning® Kit User Guide Life Technologys**. 2014. Disponível em: < [papers3://publication/uuid/84FA758F-0031-4838-ACBF-6098D68ED5A6](https://www.invitrogen.com/publication/uuid/84FA758F-0031-4838-ACBF-6098D68ED5A6) >. Acesso em: 20 set. 2018.

Kang H-w, Park D-s, Go S-j, Eun M-y. 2002. Fingerprinting of Diverse Genomes Using PCR wiht Universal Price Primers Generated from Repetitive Sequence of Korean Weedy Rice. *Molecules and cells*. 13(2):281-287.

- Kimati H, Amorim L, Bergamin Filho A, Camargo LEA, Rezende JAM. 1997. **Manual de Fitopatologia. Volume 2: Doenças das plantas cultivadas.** 3 ed. São Paulo: Agronômica Ceres Ltda.
- Kües U, Khonsuntia W, Subba S. 2018. Complex fungi. *Fungal Biology Reviews*. 32(4):205-2018.
- Kwon S-w, Myung I-s, Go S-j. 2000. Detection of *Pectobacterium chrysanthemi* Using Specific PCR Primers Designed from the 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region. *The Plant Pathology Journal*. 16(5):252-256.
- Manamgoda DS, Rossman AY, Castlebury LA, Crous PW, Madrid H, Chukeatirote E, Hyde KD. 2014. The genus *Bipolaris*. *Studies in Mycology*. 79(1):221-228.
- Mann MB. **Estudo da diversidade genotípica de *Bipolaris sorokiniana*, isolados de sementes de trigo utilizando URP-PRC.** 2010. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Mann MB, Spadari CC, Feltrin T, Frazzon APG, Germani JC, Sand STVD. 2014. Genetic Variability of *Bipolaris sorokiniana* isolates using URP-PCR. *Tropical Plant Pathology*. 39(2):163-171.
- Mann MB. **Marcadores moleculares e fenotípicos para valiação da variabilidade genética em isolados monospórios e polispóricos de *Bipolaris sorokiniana*.** 2014. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Moschen F. **Produção de esporos, densidade de inóculo e caracterização de genótipos de trigo para resistência à mancha amarela, causada por *Pyrenophora tritici-repentis*.** 2008. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária. Universidade de Passo Fundo, Passo Fundo.
- Peneriol MC, Monteiro AC, Pitelli RA. 2008. Crescimento e esporulação de *Bipolaris euphorbiae* cultivado sob diferentes condições nutricionais. *Ciência Rural*. 38(7):1907-1913.
- Peske ST, Rosenthal MDA, Rota GRM. 2003. **Sementes: fundamentos científicos e tecnológicos.** Pelotas.
- Picinini ED, Fernandes JM. **Mancha marrom.** Disponível em: < https://www.agrolink.com.br/problemas/mancha-marrom_1654.html >. Acesso em: 9 jan. 2019.
- Pires JLF. **A importância do trigo para sustentabilidade da agricultura brasileira.** 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/23416523/artigo---a-importancia-do-trigo-para-a-sustentabilidade-da-agricultura-brasileira> > Acesso em: 18 jan. 2019.

- Poloni A, Muller MGV, Pessi I, Sand STVD. 2008. Análise da variabilidade morfológica e taxa de crescimento de culturas policonidiais e monoconidiais de *Bipolaris sorokiniana*. *Biociências*. 16(1):52-63.
- Pulz P, Massola NS. 2009. Efeito de meios de cultura e fatores físicos no crescimento e esporulação de *Alternaria dauci* e *A. Solani*. *Summa Phytopathologica*. 35(2):121-126.
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ, Oberlies NH. 2017. Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*. 80(3):756-770.
- Resende D, Vekic AM. Cartilha do agricultor (O uso correto dos agrotóxicos na cultura do Trigo). 2018. Disponível em: < www.abitrigo.com.br/cloud/cartilhadoagricultor_versao_02102018.pdf%0D >. Acesso em: 4 nov. 2018.
- Santos JS, Teixeira A, Amaral DO, Vivas M, Vivas JMS, Nascimento R, Kurosawa F, Felipe S. 2016. Características culturais e patológicas de *Bipolaris maydis* em diferentes meios de cultura. *Revista Brasileira de Milho e Sorgo*. 15(3):462-469.
- Silva GS, Doihara IP. 2003. Uma Técnica para Obter Abundante Esporulação de *Phytophthora palmoriva*. *Fitopatologia Brasileira*. 28(5):568.
- Silva SR, Bassoi MC, Folini JSS. **Informações técnicas para trigo e titalce – Safra 2017/X Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale**. Brasília, Embrapa: 2017. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1064344/informacoes-tecnicas-para-trigo-e-triticale---safra-2017> >. Acesso em: 9 jan. 2019.
- Souza RG. Trigo (Análise mensal/ Agosto 2018). 2018. Disponível em: < <https://www.conab.gov.br/info-agro/analises-do-mercado-agropecuario-e-extrativista/analises-do-mercado/historico-mensal-de-trigo> >. Acesso em: 14 nov. 2018.
- Turchetto-Zolet A, Turchetto C, Zanella CM, Passaia G. Marcadores moleculares na Era Genômica: Metodologias e Aplicações. 2017. Disponível em: < https://www.sbg.org.br/sites/default/files/e_book_marcadores_moleculares_sbg_2017_final.pdf >. Acesso em: 20 ago. 2018.
- White TJ, Bruns TD, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification end direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. In: **PCR – Protocols and Applications Manual**. Academic Press. 315-322.