

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE VARIAÇÕES INTRAESPECÍFICAS E
PADRÕES DE POLIMORFISMO DE *Bipolaris sorokiniana* UTILIZANDO RFLP-ITS**

PATRÍCIA ALCÂNTARA GOMES

ORIENTADOR: SUELI T. VAN DER SAND

Porto Alegre
2009

PATRÍCIA ALCÂNTARA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE VARIAÇÕES INTRAESPECÍFICAS E
PADRÕES DE POLIMORFISMO DE *Bipolaris sorokiniana* UTILIZANDO PCR/RFLP
das regiões ITS do rDNA**

Trabalho apresentado como um dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas - Ênfase Molecular, Celular e Funcional,
na Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRGS

Orientador: Prof. Dr. Sueli Van der Sand

Porto Alegre
2009

PATRÍCIA ALCÂNTARA GOMES

**CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE VARIAÇÕES INTRAESPECÍFICAS E
PADRÕES DE POLIMORFISMO DE *Bipolaris sorokiniana* UTILIZANDO PCR/RFLP
das regiões ITS do rDNA.**

Trabalho apresentado como um dos requisitos para
obtenção do grau de Bacharel no Curso de Ciências
Biológicas - Ênfase Molecular, Celular e Funcional,
na Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRGS

Orientador: Prof. Dr. Sueli Van der Sand

Aprovada em: / /

Prof. Dr. Sueli Teresinha Van der Sand (Orientadora)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Fátima Menezes Bento (Examinador)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Prof. Dr. Patrícia Valente (Examinador)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dra. Sueli Teresinha Van der Sand, minha orientadora, pelo constante estímulo, apoio, dedicação, paciência, carinho e amizade, pelos ensinamentos indispensáveis para minha plena formação durante a iniciação científica, e por ser um exemplo de profissionalismo.

Aos professores do Departamento de Microbiologia pela amizade, pelo auxílio, pelas sugestões e pela acolhida na sala dos professores e em seus laboratórios sempre que necessário.

Aos colegas do curso e amigos pelas sugestões, amizade e companheirismo, em especial à Lindsey de Freitas Cassini, Emilly Villodre e Fernanda da Silva Moreira.

Aos colegas de laboratório pela disponibilidade e imprescindível auxílio nas atividades laboratoriais e apoio para a realização deste trabalho, Cristina, Francielle, Fernanda, Élio, em especial à Michele Mann pelos ensinamentos e à Adriane Ramos Zimmer e Valdionir Freitas pela amizade, apoio e carinho.

Aos colegas do laboratório de virologia pela paciência, disposição, sugestões, ensinamentos e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os amigos e familiares que, mesmo distantes, contribuíram para a realização deste estudo, fornecendo apoio e carinho.

Aos meus pais, meu padrasto e meu irmão, por entenderem momentos de silêncio e distância, e pelo constante estímulo e apoio. E ainda pela amizade, pelo amor e

principalmente pela compreensão nos momentos mais críticos, e pela descontração nos momentos mais tensos.

CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA DE VARIAÇÕES INTRAESPECÍFICAS E PADRÕES DE POLIMORFISMO DE *Bipolaris sorokiniana* UTILIZANDO PCR/RFLP das regiões ITS do rDNA.

Autor: Patrícia Alcântara Gomes

Orientadora: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van der Sand

RESUMO

O fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana* infecta diversas gramíneas causando moléstias como a podridão comum da raiz, carvão do nó, mancha marrom e ponta preta dos grãos. Dentre as gramíneas infectadas encontramos a cevada, o trigo, triticale e outros. O trigo representa, no âmbito mundial, a segunda maior cultura de grãos, no entanto, o Brasil está entre os três maiores importadores mundiais de trigo. A principal fonte de inóculo do fitopatógeno é a semente, contudo a elevada variabilidade morfológica e fisiológica de *B. sorokiniana* dificulta a sua identificação, assim como o tratamento das sementes infectadas. Sendo assim, a caracterização molecular do fitopatógeno se mostra de fundamental importância. O objetivo desse trabalho foi estudar a diversidade genotípica de *B. sorokiniana* isolados de sementes de trigo do Brasil e de outros países utilizando PCR-RFLP das regiões ITS do rDNA ribossomal. Para tanto, quarenta isolados polispóricos foram utilizados. Foi realizada a extração, purificação e quantificação do DNA genômico e as reações de amplificação foram realizadas com os oligonucleotídeos iniciadores universais para fungos ITS4 e ITS5. Todos os isolados apresentaram um produto de amplificação com aproximadamente 600pb, esperado para as regiões ITS, junto com o segmento 5.8S do rDNA. Os produtos das amplificações foram digeridos com a endonuclease de restrição *EcoR* I e os produtos de amplificação e clivagem submetidos à eletroforese em gel não desnaturante de poliacrilamida 8% para posterior análise dos perfis dos fragmentos de DNA. Os dados obtidos a partir da RFLP das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 dos isolados revelaram a presença de polimorfismo intra-específicos.

Palavras-chave: *Bipolaris sorokiniana*, fitopatógeno, ITS.

GENOTYPIC CHARACTERIZATION OF INTRASPECIFIC VARIATIONS AND PATTERNS OF POLYMORPHISM *Bipolaris sorokiniana* USING RFLP-ITS.

Author: Patrícia Alcântara Gomes

Adviser: Prof. Dr. Sueli Teresinha Van der Sand

ABSTRACT

The pathogen *Bipolaris sorokiniana* infects several grasses causing diseases such as common root rot, charcoal node, brown spot and black point of the grains. Among the grasses found infected barley, wheat, triticale and others. The wheat represents, at the global, the second largest grain crop, however, Brazil is among the world's three largest importers of wheat. The main source of inoculum of the pathogen is the seed, but the high variability of morphological and physiological *B. sorokiniana* difficult to identify them, as well as the treatment of infected seeds. Thus, the molecular characterization of the pathogen be essential. The aim of this work is to study the genotypic diversity of *B. sorokiniana* isolated from wheat seeds from Brazil and other countries using RFLP-ITS. For this, forty isolates were used. It made the extraction, purification and quantification of genomic DNA and amplification reactions were performed with universal primers for fungi ITS4 and ITS5. All isolates showed an amplification product of approximately 600pb, expected for the ITS region, along with the 5.8S rDNA segment. The products of amplification were digested with restriction endonucleases EcoR I and Hind III and the amplification products were subjected to cleavage and gel electrophoresis nondenaturing 8% polyacrylamide for further analysis of the profiles of DNA fragments. The data obtained from the RFLP regions ITS1, 5.8S and ITS2 of the isolates revealed the presence of intra-specific polymorphism.

Key words: *Bipolaris sorokinian*, pathogen, ITS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Variabilidade morfológica entre os isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	40
Figura 2 Microcultivo mostrando os conídios, estruturas reprodutivas utilizadas para identificação da espécie <i>Bipolaris sorokiniana</i>	40
Figura 3 Região do rDNA com as regiões ITS1 e ITS2.....	16
Figura 4 Quantificação do DNA genômico dos isolados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo.	17
Figura 5 Resultado da amplificação das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 utilizando os oligonucleotídios ITS4 e ITS5.....	19
Figura 6 Digestão realizada com a enzima <i>EcoR I</i> no gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo.	22
Figura 7 Perfil dos fragmentos de DNA da digestão realizada com a endonuclease de restrição <i>EcoR I</i> dos isolados em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo.	22

LISTA DE TABELA

Tabela 1 Origem dos isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	13
Tabela 2 Fragmentos resultantes da digestão com endonuclease <i>EcoR I</i>	20

LISTA DE ABREVIATURAS

ARDRA	Análise de Restrição do DNA Ribossomal Amplificado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeos trifostatados
ITS	Espaçador Interno Transcrito
KDa	Quilo-Dáton
M	Molar
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
rDNA	Ácido desoxirribonucléico Ribossômico
RFLP	Análise de restrição de fragmentos polimórficos
RNA	Ácido ribonucléico
µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	03
2.1	O fitopatógeno.....	03
2.2	A cultura do trigo	05
2.3	Processo de infecção e patogenicidade.....	06
2.4	Variabilidade intraespecífica.....	09
2.5	Biologia molecular e o estudo de fungos fitopatogênicos	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	Amostras.....	12
3.2	Manutenção das culturas de <i>B. sorokiniana</i>.....	12
3.3	Preparação do micélio para extração do DNA genômico	12
3.4	Extração e purificação do DNA genômico	14
3.5	Quantificação do DNA	14
3.6	Amplificação das regiões ITS (PCR-ITS).....	15
3.7	Clivagem com endonuclease de restrição dos produtos de amplificação	16
4	RESULTADOS	17
4.1	Extração e Purificação do DNA genômico	17
4.2	Quantificações do DNA total	17
4.3	Concentração dos oligonucleotídeos iniciadores e cloreto de magnésio	18
4.4	Produtos da amplificação.....	16
4.5	Análise da região amplificada digerida com endonuclease de restrição.....	19
5	DISCUSSÃO	24
6	CONCLUSÕES.....	26
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
	REFERÊNCIAS	28
	APÊNDICE	34

1 INTRODUÇÃO

O trigo é o cereal mais comercializado mundialmente, sendo plantado em aproximadamente 17% do total das terras cultivadas do mundo. Estima-se que as populações dos países em desenvolvimento consumam hoje metade do trigo produzido no mundo e que nos próximos dez anos esse consumo alcançará 60%, podendo chegar em 2020 a uma demanda 40% maior do que a necessária atualmente (CIMMYT, 2009). Segundo dados preliminares da safra de 2004/2005 de trigo e outros grãos, observou-se que o trigo é a 2ª cultura de grãos em produção, em nível mundial, sendo sobrepujado apenas pelo milho em 13,5% em produção, pelas novas estimativas (COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO-2005).

Segundo o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2009), os maiores exportadores de trigo do mundo são os EUA, Rússia, União Européia, Canadá e Argentina. O Brasil está entre os três maiores importadores mundiais de trigo, segundo a U.S. Wheat Associates (2009). Isso porque, nos últimos anos, o Brasil tem demonstrado uma perda da produtividade na cultura do trigo.

Além das dificuldades econômicas, intrínsecas a importação, encontradas em virtude das políticas protecionistas, o referido desfecho tem como umas das causas a incidência de doenças que atacam a planta sendo responsáveis pela perda ou baixos rendimentos na produção de grãos. Muitas dessas doenças são de origem fúngica como é o caso da “helmintosporiose”, cujo agente causador pode ser o fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana* (NASCIMENTO, 2004; SILVA, 1992).

Uma das principais fontes de inóculo do fitopatógeno é a semente (REIS et al., 2001a), uma vez que o uso de sementes infectadas produzem um aumento na intensidade da doença na lavoura. Assim sendo, o emprego de sementes saudáveis ou anteriormente tratadas de maneira

adequada, consistem em uma importante medida de controle do fungo. Justamente por essas razões é indispensável o diagnóstico adequado da presença de *B. sorokiniana* em sementes.

Contudo, *B. sorokiniana* apresenta uma elevada variabilidade morfológica (FIGURA 1, presente no apêndice) e fisiológica que dificultam a sua identificação. Para tanto é necessário o uso de técnicas de biologia molecular como PCR (*Polymerase Chain Reaction*), bem como a análise das regiões ITS (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal associadas com RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). A detecção da variabilidade genética e a caracterização de raças fisiológicas e/ou *formae speciales* são dois importantes pré-requisitos para o desenvolvimento de marcadores moleculares e de variedades resistentes à “helminthosporiose”.

Para tanto, o presente estudo teve por objetivos:

- Estudar a diversidade genotípica de *B. sorokiniana* isolados de sementes de trigo e cevada do Brasil e de outros países;
- Verificar a presença de polimorfismos intraespecíficos das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 do rDNA de isolados de *B. sorokiniana*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O fitopatógeno

Bipolaris sorokiniana [(Sacc. In Sorok) Shoemaker; teleomorfo *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi)] é um fungo que ataca uma ampla variedade de gramíneas: sorgo (*Sorghum sp.*), centeio (*Secale cereale*), aveia (*Avena sativa*), trigo (*Triticum aestivum L.*), cevada (*Hordeum vulgare L.*) e outros cereais. Também tem sido relatado parasitando feijão (*Phaseolus sp.*), alfafa (*Melilotus sp.* e *Melicago sp.*), trevo vermelho e amarelo (*Oxalis sp.*) (TINLIE, 1988).

O fitopatógeno *B. sorokiniana* pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, família Dematiaceae (ALEXOPOULOS & MIMS, 1985). Os fungos pertencentes a essa categoria taxonômica são chamados de fungos imperfeitos ou mitospóricos, pois possuem apenas a reprodução assexuada (conidial) como forma de propagação da espécie (NASCIMENTO, 2004). Quando um fungo apresenta as fases anamórfica e teleomórfica, segundo as regras de nomenclatura botânica, se utiliza o nome da fase teleomórfica, podendo ser citado o nome da forma anamórfica entre parênteses. Contudo, se o estudo for restrito à fase conidial, somente será utilizado o nome dado a essa fase (COSTA, 1983).

A fase teleomórfica, também chamada de forma sexual ou ascógena, é rara na natureza (STOLTE, 2006). E segundo Kumar et al. (2002), a ocorrência dessa fase em *B. sorokiniana* se deu na Zâmbia em 1988, não havendo posterior relato de sua presença em condições naturais. Contudo, a forma sexual pode ser produzida em laboratório na presença de material vegetal e demais condições de cultivo (INGRAM & WILLIAMS, 1988).

O fungo *B. sorokiniana* é um sério patógeno para o trigo e para a cevada na América do Norte e do Sul, bem como para muitos países da Ásia (DUCZEK & JONES-FLORY, 1994; GREY et al., 1984; KNUDSEN et al., 1995; KUTCHER et al., 1994; SHARMA et al., 2004; VAN GINKEL & RAJARAM, 1998). Dentre a grande variedade de sintomas produzidos por esse patógeno em diversas partes vegetais, a mancha marrom foliar tem sido o principal estresse biótico limitando a produção comercial de trigo e cevada (IBEAGHA et al., 2005).

B. sorokiniana é capaz de sobreviver tanto no solo, quanto em restos vegetais infectados. Alguns conídios possuem células internas que ao caírem no solo se transformam em clamidósporos, uma forma de resistência, possibilitando a sobrevivência do fungo diretamente no solo por longos períodos de tempo, independentemente da presença de um hospedeiro (MERONUX & PEPPER, 1968). Sua capacidade de permanecer no solo como esporo dormente consiste numa vantagem quando comparado a demais fitopatógenos necrotróficos, que não sobrevivem sem a presença de restos culturais. Por essa razão, e pelo fato de que algumas espécies de gramíneas silvestres suportam baixos níveis do fungo, é difícil eliminá-lo totalmente das áreas agrícolas afetadas. O patógeno foi isolado de lesões radiculares de algumas gramíneas forrageiras invasoras e nativas, tais como: azevém (*Lolium multiflorum*), fetusca (*Festuca arundinacea*), capim-lanudo (*Holcus lanatus*), pensacola (*Paspalum saraurae*), capim-arroz (*Echinochloa cruzgalli*), capim-colchão (*Digitaria sanguinalis*) e de itapuã (*Brachiaria plantaginea*) (MÜLLER, 2000).

Em virtude de encontrar-se largamente disseminado pelas regiões tritícolas do Brasil ocasionando moléstias em diferentes órgãos da planta, recebe uma variedade de denominações: podridão comum da raiz, mancha marrom, carvão do nó e ponta preta dos grãos (NASCIMENTO, 2004).

2.2 A cultura do trigo

O trigo tem sua origem na Ásia, sendo introduzido na Índia, na China e na Europa a aproximadamente 5000 mil anos a.C. (NASCIMENTO, 2004). Achados arqueológicos indicam o trigo como sendo o segundo grão cultivado, após a cevada. Apontam para a importante contribuição desse cereal no desenvolvimento da civilização ocidental, proporcionando o sedentarismo em detrimento da caça e da coleta (CUNHA et al., 1999).

O trigo (*Triticum aestivum* L.) é uma cultura de grande importância no âmbito mundial (STOLTE, 2006), sendo o cereal mais comercializado mundialmente (CIMMYT, 2009). Além disso, é a principal fonte energética na alimentação da população de muitos países e a segunda cultura de grãos ficando atrás apenas do milho (ZYLBERSZTAJN et al., 2004).

O auge da triticultura brasileira ocorreu em 1987, data na qual foram semeados mais de 3,8 milhões de hectares, com a produção atingindo 6,2 milhões de toneladas (CUNHA & BACALTCHUK, 2000). Infelizmente, nos tempos atuais o Brasil tem importado em torno de 50% do trigo necessário para a demanda do país (CONAB, 2009). De acordo com a Embrapa no ano de 2008 o Brasil importou mais de 4 milhões de toneladas de trigo só da Argentina, além de haver importado o cereal dos Estados Unidos, Paraguai e Canadá.

A necessidade de importação ocorre em razão da baixa produtividade devido às condições climáticas favoráveis ao desenvolvimento de doenças fúngicas, constituindo fatores limitantes tanto para a produção quanto para a qualidade dos grãos colhidos (TORNO, 1992).

2.3 Processo de infecção e patogenicidade

B. sorokiniana causa lesões necrotróficas na superfície da folha do trigo e da cevada (DEHNE & OERKE, 1985). O mecanismo de patogenicidade inclui a germinação dos conídios na superfície foliar e a elaboração de um apressório a partir do tubo germinal que suporta diretamente a penetração pela infecção da hifa através da cutícula da planta hospedeira (BIDARI & GOVINDU, 1979). A patogenicidade está associada com a produção de toxinas (LUDWIG, 1957; PRYCE et al., 1999). O papel das toxinas é confirmado pelo fato de que a formação das lesões necrotróficas desencadeiam, não apenas a colonização sobre a folha pelo patógeno, mas também sem a penetração através da germinação conidial (DEHNE & OERKE, 1985).

O fitopatógeno possui capacidade de infectar diversos órgãos da planta hospedeira durante toda a fase de desenvolvimento da cultura. Quando esse ataca os órgãos verdes da planta, causando interferência no processo fotossintético, a doença recebe o nome de mancha marrom, quando ataca as raízes, interferindo na absorção de nutrientes e água, recebe o nome de podridão comum das raízes (REIS, 1982a). Durante o processo de infecção ocorre uma fase biotrófica de crescimento do fungo sobre o hospedeiro, sendo esta a penetração da cutícula e da parede celular. Após, tem-se o desenvolvimento de hifas dentro das células da epiderme seguida da fase necrotrófica, na qual tem-se a invasão do mesófilo e morte das células atacadas (KUMAR et al., 2002).

As toxinas produzidas pelo fungo durante a infecção são sesquiterpênicas e são sintetizadas a partir do farnesol. O composto ativo em maior quantidade é o pre-helminthosporol cujo efeito é inibitório sobre a ATPase (KUMAR et al., 2002). A referida toxina possui característica anfipática funcionando como um detergente, facilitando assim o amolecimento da camada cerosa da cutícula (NILSON et al., 1993). Segundo Kumar et al.

(2002), o helmintosporol é outra enzima envolvida no processo de infecção que afeta a permeabilidade da membrana, a fosforilação oxidativa, a fotofosforilação e o bombeamento de prótons através da membrana plasmática. Nakajima et al. (1994) isolaram de filtrados de cultura fúngica, um composto a que deram o nome de “sorokiniana”. Esse composto apresenta efeito inibitório sobre a germinação de sementes de aveia.

Antes dos sintomas da mancha marrom se manifestarem na folha, aparecem nas plúmulas originadas de sementes infectadas. Plântulas em pré e pós-emergência oriundas de lotes cuja incidência fúngica é alta, acabam morrendo. Inicialmente, é possível visualizar nas folhas pequenas manchas alongadas de cor marrom-escura à negra, que quando desenvolvidas, apresentam-se elípticas e são dotadas de esporulação em quantidade, sobretudo na região central. Uma vez que as lesões coalescem, a folha fica crestada, seca e morre prematuramente. Algo semelhante ocorre na espiga: as espiguetas infectadas, quando mortas tem coloração palha, chamada cabeça branca, vindo a tornar-se enegrecidas caso haja a frutificação do fungo. Ainda nos nós e entrenós pode haver lesões de cor castanho-escuro em função da presença dos conídios, doença denominada carvão do nó. A planta pode sofrer quebra e conseqüente morte devido ao estrangulamento causado por essas lesões. Além disso, espigas infectadas podem ter seus grãos apresentando o sintoma denominado ponta preta. Contudo, esse sintoma nem sempre se manifesta, de forma a mascarar sementes infectadas em sadias (MEHTA, 1978; REIS & FORCELINI, 1993).

Segundo Picinini & Fernandes (2003) a mancha marrom causada por *B. sorokiniana* está entre as doenças de maior importância, pelos danos que podem causar na cultura do trigo. No Brasil, a mancha marrom compõe a lista de doenças com grande impacto econômico, possuindo elevada incidência e transmissão em sementes, oscilando de 60 a 90% com tratamento de sementes e baixo risco geral (CABI, 2000).

O cultivo de uma mesma espécie vegetal em larga escala, pode contribuir para a ocorrência de epidemias, fazendo-se necessário o uso de medidas rápidas, práticas e eficientes no controle de doenças e, no caso específico dos cereais de inverno como trigo, cevada e aveia, os fungicidas têm papel fundamental na sustentabilidade econômica (STOLTE, 2006).

O tratamento com fungicidas das sementes infectadas é recomendado apenas para lotes com incidência inferior a 30%, acima deste valor a eficiência do produto fica comprometida. O uso de fungicidas constitui um dos principais métodos de controle de doenças e pragas de plantas, quer pela facilidade de uso como também pelos resultados imediatos, porém seu uso constante pode promover a seleção de fungos resistentes colocando em risco a eficiência do método (GHINI & KIMARTI, 2002).

Em fevereiro de 1999 o Ministério da Agricultura e do Abastecimento instituiu, em nível nacional, o Programa de Sanidade de Pragas Não Quarentenárias Regulamentáveis na Produção e Comercialização de Sementes por meio da Portaria nº71 de 22 de fevereiro de 1999, aspirando à adoção de controle de qualidade em nível de campos de produção de sementes e análise laboratorial de sanidade de pragas não quarentenárias regulamentáveis, entre elas *B. sorokiniana*. O objetivo do Programa foi estabelecer um marco para a formulação e aplicação de medidas fitossanitárias harmonizadas e para a elaboração de normas internacionais com esta finalidade. A medida foi tomada reconhecendo a necessidade da cooperação internacional para controlar e prevenir as pragas de plantas e produtos vegetais, bem como sua disseminação internacional, e especialmente sua introdução em áreas ameaçadas (CIPV, 2009).

2.4 Variabilidade intraespecífica

B. sorokiniana apresenta uma alta variabilidade morfológica e fisiológica intraespecífica, o que dificulta sua identificação. Valim-Labres et al. (1997), concluíram que características morfológicas não apresentam relação com a virulência. Na realidade, a condição haplóide do fungo, por impedir que alterações genéticas fiquem ocultas, acaba gerando a grande variabilidade comportamental observada por expressar o fenótipo.

Segundo Frank (1992), populações de fitopatógenos são sensíveis ao genótipo do hospedeiro e às variações no meio ambiente. Frequentemente, populações de plantas são geneticamente polimórficas para a resistência a patógenos. E de forma análoga, os patógenos são polimórficos para genes de virulência que podem quebrar a resistência do hospedeiro. Esses dados sugerem que polimorfismos planta-patógeno se mantêm continuamente num ciclo coevolutivo entre as populações, juntamente com a migração ocasional de genes para virulência e resistência oriundos de populações distantes.

A instabilidade cultural de fungos fitopatogênicos mitospóricos isolados da natureza, levou Hansen (1938) a propor a existência de dois estados morfológicos observados: o estado conidial cuja produção de conídios é abundante e o estado micelial cuja produção de conídios é pouca ou nenhuma embora possua grande quantidade de hifas aéreas. A esse fenômeno foi atribuído a variação na proporção de núcleos do tipo conidial e do tipo micelial no heterocário.

Os mecanismos que conferem variabilidade em fungos fitopatogênicos são a mutação, a parassexualidade, a heterocariose, a recombinação somática em fungos imperfeitos e a recombinação sexual em fungos das demais classes (TINLIE & MACNEILL, 1969; AZEVEDO, 1976). Klister & Miao (1992) observaram que alguns fungos filamentosos

possuem cromossomos supranumerários ou cromossomos “B” que participam da variação da patogenicidade, afinal carregam genes de virulência.

2.5 Biologia molecular e o estudo de fungos fitopatogênicos

Considerando o estudo de fitopatógenos, o uso de critérios morfológicos deve ser o primeiro passo de identificação, mas algumas características morfológicas podem ter origem na instabilidade do isolado e/ou nas condições de cultivo. Para tanto, análises fenotípicas devem ser confirmadas através de características genéticas (FERRON, 1978).

A reação em cadeia da polimerase (PCR – “*Polymerase Chain Reaction*”) como ferramenta molecular foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (SAIKI et al., 1988; MULLIS & FALOONA, 1987). A sensibilidade da técnica, bem como sua rapidez, versatilidade e facilidade fizeram da PCR uma técnica largamente utilizada na identificação de indivíduos via análise genética molecular. A técnica consiste em promover milhares de cópias de um segmento específico de DNA a partir da atividade enzimática da DNA polimerase (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

A amplificação das regiões ITS (PCR-ITS) e o sequenciamento ou clivagem com endonucleases de restrição tem sido bastante utilizada no estudo de fungos. A técnica de análise de restrição de fragmentos polimórficos das regiões ITS do rDNA (RFLP-ITS, também chamada ARDRA-ITS) consiste na amplificação pela técnica da PCR de uma das regiões ITS, das regiões ITS1 e ITS2 juntamente com o fragmento 5.8S ou das duas regiões separadamente, seguida da clivagem do produto da amplificação com endonucleases de restrição. Os fragmentos resultantes são separados de acordo com seus tamanhos através de eletroforese em gel. Pelo fato de as regiões ITS apresentarem sequências de bases variáveis

que ficam entre sequências de bases conservadas (18S, 5.8S e 25S) elas podem ser amplificadas utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores universais, baseados nas sequências conservadas. Os polimorfismos são evidenciados pelos fragmentos produzidos pelas endonucleases de restrição. Os fragmentos formados podem ter tamanhos diferentes dentre os indivíduos de uma mesma população, o que caracteriza um polimorfismo (LOUREIRO, 1994). A base genética do polimorfismo observado é resultante de mutações nos sítios de restrição, de inserções, de deleções e de rearranjos entre esses sítios (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995). A frequência com a qual os polimorfismos são detectados depende das enzimas de restrição empregadas e da diversidade genética do organismo em estudo (MICHELMORE & HULBERT, 1987).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras

Foram empregados 40 isolados de *Bipolaris sorokiniana* de diferentes regiões do Brasil e de outros países conforme TABELA 1.

3.2 Manutenção das culturas de *B. sorokiniana*

Os isolados de *B. sorokiniana* foram cultivados em placas contendo meio BDA (agar batata dextrose). Após o desenvolvimento das colônias, foi realizado microcultivo (FIGURA 2 – apêndice) para confirmar a identidade taxonômica do fungo. Confirmada a identidade, os isolados foram cultivados em tubos contendo meio BDA inclinado e conservados em geladeira a 4°C, renovando-se as culturas a cada quatro meses.

3.3 Preparação do micélio para extração do DNA genômico

A massa micelial para extração do DNA foi obtida inoculando-se o micélio em Erlenmeyer contendo 250 mL de meio BD (batata dextrose) . Os fungos foram incubados sob agitação por um período de 10 dias ou até atingirem de 10 a 20 g de peso de massa micelial aproximadamente. Após, a massa micelial de cada isolado foi filtrada, lavada por três vezes em água destilada esterilizada e o excesso de água foi removido com um papel filtro esterilizado. O micélio foi pesado e macerado com a adição de nitrogênio líquido até a obtenção de um pó fino para extração do DNA.

TABELA 1. Origem dos isolados de *Bipolaris sorokiniana*.

ISOLADO	PROCEDÊNCIA
98003	Pelotas-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
BS15M2	Delicias, Chihuahua – México (CIMMYT-México)
CS10-04	Hanoi-Vietnam (CIMMYT-México)
98004	Cruz Alta-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
BS16M1	Delicias, Chihuahua – México (CIMMYT-México)
BS18M2	Poza Rica, Veracruz – México (CIMMYT-México)
BS18M1	México (trigo) (CIMMYT-México)
BS52M1	Monterrey, Nuevo Leon – México (CIMMYT-México)
98007	Cruz Alta-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
CF02-01	África do Sul – (CIMMYT-México)
BS29	Batán, Estado de México – (CIMMYT-México)
98010	Santa Rosa-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98011	Lagoa Vermelha-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
1965	Dinamarca - (CIMMYT-México)
98012	Lagoa Vermelha-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
A20	Canadá (CIMMYT-México)
98013	Vitória-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98014	Lagoa Vermelha-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98017	Samambaia-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98018	Vitória-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98019	Taquá-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98021	Vitória-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98022	Selbach-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98023	Vitória-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98025	Piratini-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98026	Piratini-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98028	Pelotas-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98029	Piratini-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98030	Cruz Alta-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98031	Nova Estância-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98032	ENG. Beltrão-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98033	Landoi-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98040	Piratini-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98041	Vitória-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98042	Piratini-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
98043	Pelotas-RS (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
CV13	Guarapuava-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
CV48	Tapera-PR (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
1992	Planaltina-GO (CNPT- Embrapa-Passo Fundo)
NRRL5851	África do Sul (CIMMYT- México)

3.4 Extração e purificação do DNA genômico

Para este propósito foi utilizado o protocolo desenvolvido por Ashktorab e Cohen (1992), com as adaptações necessárias ao fitopatógeno em estudo. Ao pó de micélio (na proporção de 1mL por grama) foi adicionado tampão de extração (200mM Tris-HCL pH 8,0, 250mM NaCl, 25mM EDTA pH 8,2, 2% dodecil sulfato de sódio (SDS), 10 µL/mL de β-mercaptoetanol (sigma) e 50 µg/mL de proteinase K. O material ficou incubado em banho-de-água a 64° C por 60 minutos e após foi centrifugado a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante coletado foi transferido para tubos de centrifuga limpos. A extração do DNA prosseguiu com duas extrações com 1 volume de fenol. A fase aquosa coletada foi transferida para tubos limpos e o procedimento de extração repetido três vezes com fenol/clorofórmio, na proporção de ½ volume. Na etapa seguinte, 1 volume de clorofórmio/álcool isoamílico foi acrescentado para cada volume do sobrenadante e novamente submetido a centrifugação. Para precipitação do DNA extraído foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de álcool isopropílico resfriado a -20°C. O DNA precipitado foi coletado com um bastão de vidro, transferido para um tubo Falcon, lavado com etanol 70% e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. Depois de seco a temperatura ambiente, o DNA foi ressuspensionado em água destilada deionizada, quantificado e estocado a - 20°C.

3.5 Quantificação do DNA

Para calcular a concentração do DNA genômico foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%. Como padrão de tamanho molecular foi utilizado o DNA de fago Lambda em

concentrações de 250ng/μL, 125ng/μL e 63ng/ μL. A quantificação foi feita comparando-se visualmente a intensidade dos fragmentos das amostras com as concentrações citadas. A fim de auxiliar na migração dos DNAs genômicos foi adicionado tampão de amostra (APÊNDICE 1.9) a cada sistema, permitindo a visualização da migração das amostras no gel de agarose. A migração dos fragmentos foi realizada em uma cuba de eletroforese contendo tampão 1X TAE (APÊNDICE 1.7) com uma corrente de 70mA, por aproximadamente 40 minutos.

3.6 Amplificação das regiões ITS (PCR-ITS)

Para a amplificação foi utilizado o DNA genômico de todos os isolados e oligonucleotídeos iniciadores antisense ITS4 5' (TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') e sense ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3') (FIGURA 3). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25 μl contendo: 30ng de DNA, 0,4U de *Taq* DNA-polimerase, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 μM dos oligonucleotídeos iniciadores, 0,2 mM dNTPs, e 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM KCl. As temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores foram estabelecidas após a realização de testes de amplificação, partindo-se de temperaturas recomendadas por White & Bruns (1990) até obter a melhor temperatura para a amplificação das regiões estudadas no estudo. Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 0,8%. Para a amplificação do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores ITS4 e ITS5 foi empregado: um primeiro ciclo de 4 minutos a 95°C; seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C; 1 minuto a 60°C e 2 minutos a 72°C; Após, um ciclo de extensão de 72°C por 10 minutos foi adicionado ao programa.

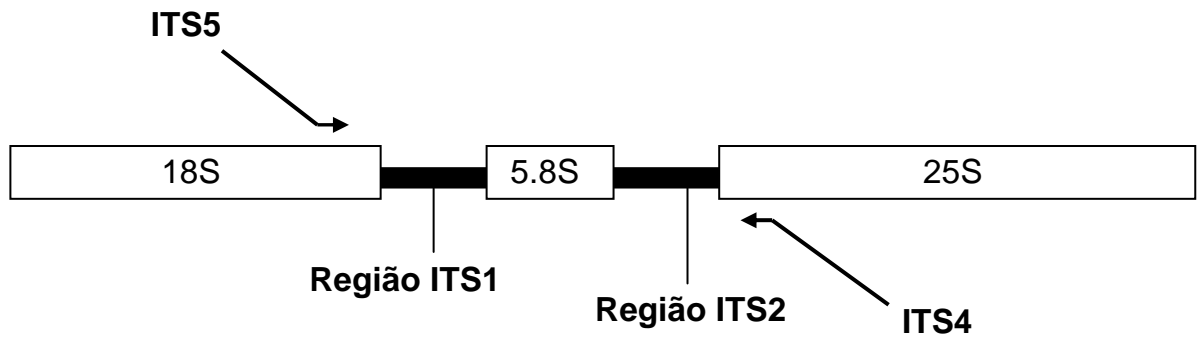


FIGURA 3. Região do rDNA com as regiões ITS1 e ITS2. As setas indicam as regiões de anelamento de cada oligonucleotídeo iniciador.

3.7 Clivagem com endonuclease de restrição dos produtos de amplificação

A digestão dos produtos amplificados foi realizada com endonucleases de restrição que reconhecem determinadas sequências de bases no DNA. O sistema foi preparado conforme indicação do fabricante para cada enzima e incubado em banho de água. A presença de polimorfismo é identificada quando há presença de um fragmento em um isolado cuja ausência seja confirmada nos demais. O produto das digestões foi visualizado em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo.

4 RESULTADOS

4.1 Extração e Purificação do DNA genômico

A extração e purificação do DNA genômico foram realizadas conforme descrito no item 3.4. Os isolados tiveram sua biomassa medida por método direto através da inoculação dos isolados em meio não-sólido (BD) seguida da pesagem do micélio.

4.2 Quantificações do DNA total

A quantificação foi realizada comparando-se visualmente a intensidade das bandas das amostras com as concentrações já conhecidas de DNA λ de 250ng/ μ L, 125ng/ μ L e 63ng/ μ L. A visualização foi realizada em um gel de agarose 0,8%. (FIGURA 4). A diferença da intensidade dos fragmentos entre os isolados, considerando o DNA genômico, pôde ser observada e quantificada. Posteriormente, o DNA total dos isolados foi diluído quando necessário para se obter uma concentração de aproximadamente 30ng.

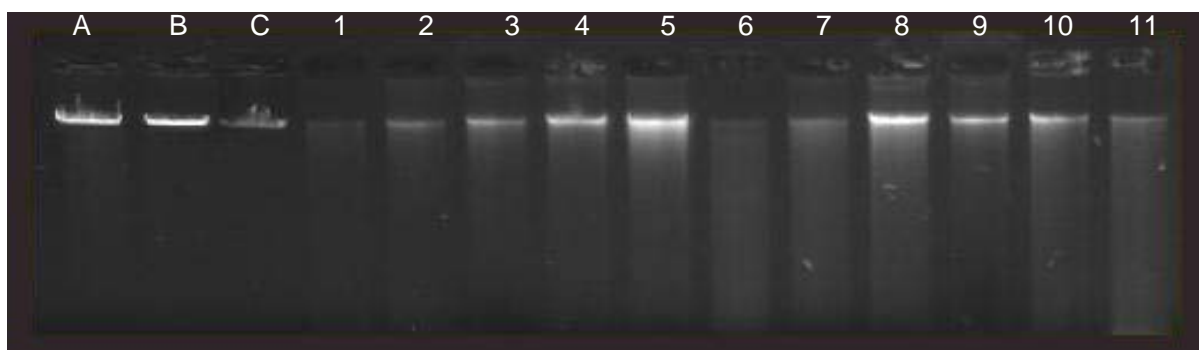


FIGURA 4. Quantificação do DNA genômico dos isolados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. (A) DNA λ na concentração 250ng/ μ L. (B) DNA λ na concentração 125ng/ μ L. (C) DNA λ na concentração 63ng/ μ L. (1) 98003; (2) BS15M2; (3)

CS10-04; (4) 98004; (5) BS16M1; (6) BS18M2; (7) 98007; (8) BS29; (9) 98010; (10) 98011; (11) 1965.

4.3 Concentração dos oligonucleotídeos iniciadores e cloreto de magnésio

Foram testadas diferentes concentrações de oligonucleotídeos iniciadores: 0,3 μM , 0,2 μM , 0,15 μM e 0,1 μM por reação, com o objetivo de determinar a concentração ideal para obter uma boa intensidade e reproduzível reação de PCR. Após os ensaios optou-se pela concentração de 0,2 μM por manter essas características. De mesma forma foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio (3 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM), que atua como cofator da enzima *Taq* DNA polimerase e ajuda a dissolver melhor os dNTPs na mistura (MIX) de reagentes, sendo selecionada a concentração de 1,5mM.

4.4 Produtos da amplificação

Todos os isolados foram amplificados com os oligonucleotídeos ITS5 e ITS4. Os produtos de amplificação dos isolados de *B. sorokiniana* revelaram um fragmento de aproximadamente 600pb (FIGURA 5). O fragmento esperado foi encontrado em todos os isolados.

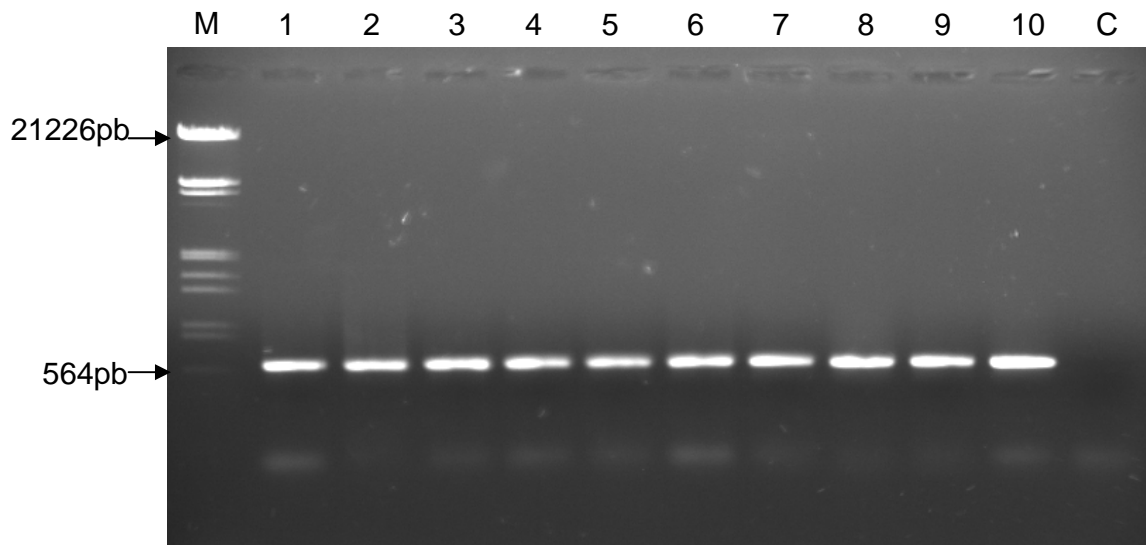


FIGURA 5. Resultado da amplificação das regiões ITS1, 5.8S e ITS2 utilizando os oligonucleotídeos ITS4 e ITS5. O gel de agarose 0,8% foi corado com brometo de etídeo. O fragmento presente nos isolados tem aproximadamente 600pb. (M) marcador de peso molecular λ digerido com *EcoR I* / *Hind III*. (1) 98012; (2) 98013; (3) 98014; (4) 98017; (5) 98018; (6) 98021; (7) 98022; (8) 98023; (9) 98025; (10) 98026; (11) Controle negativo.

4.5 Análise da região amplificada digerida com endonuclease de restrição

A partir dos produtos amplificados dos 40 isolados foram realizadas digestões com a endonuclease de restrição *EcoR I* que reconhece 6 pares de bases no fragmento de DNA. Para a visualização do resultado das digestões, inicialmente foi testado o gel de agarose a 3%, contudo não foi possível visualizar a separação dos fragmentos gerados (FIGURA 6). O marcador utilizado no gel de agarose foi o λ *EcoR I* / *Hind III*. Após, foi utilizado gel não desnaturante de poliacrilamida 8%, para visualização dos fragmentos gerados após o processo

de digestão. A presença de fragmentos encontrados sugere que existe polimorfismo na região amplificada entre os isolados (FIGURA 7).

A endonuclease *EcoR I* gerou 6 fragmentos identificáveis designados a1 a a6. O fragmento designado como a1 apresentou aproximadamente 71pb, a2 com 95pb, a3 com 283pb, a4 com 310pb, a5 com 342pb e a6 com 375pb. Os fragmentos encontrados com maior frequência entre as amostras foram a2 e a6. O resultado dos fragmentos encontrados encontra-se na TABELA 2.

TABELA 2. Fragmentos resultantes da digestão com endonuclease *EcoR I*.

Isolado/Fragmentos	a1	a2	a3	a4	a5	a6
98003	-	-	-	+	+	-
BS15M2	-	-	-	+	+	-
CS10-04	-	+	-	-	-	+
98004	-	-	-	+	+	-
BS16M1	+	-	+	-	+	-
BS18M2	-	+	+	-	-	-
BS18M1	-	+	-	-	+	-
98007	-	+	-	-	+	-
BS29	-	+	-	-	-	+
98010	-	+	-	+	-	+
98011	+	-	-	+	-	-
1965	-	+	+	-	-	-
98012	-	-	-	-	-	+
A20	+	-	-	-	-	+
98013	-	+	-	+	-	+
98014	-	+	-	-	+	-
98017	-	-	-	+	-	+
98018	-	-	+	-	-	-
98019	+	-	-	+	-	-

98021	-	-	-	-	-	+
98022	-	+	-	-	-	+
98023	-	+	-	-	-	+
98025	-	-	-	-	-	+
98026	-	+	+	-	-	-
98028	-	-	-	+	+	-
98029	-	-	+	-	-	-
98030	-	-	-	+	-	+
98031	-	+	-	+	-	-
98032	+	-	+	-	+	-
98033	-	+	-	-	-	+
98040	-	-	+	-	-	-
98041	-	+	-	+	-	+
98042	-	-	+	-	-	-
98043	-	+	+	-	-	-
CV13	+	-	-	-	-	+
CV48	-	+	-	-	-	+
1992	-	+	-	-	-	+
NRRL5851	-	-	+	-	+	-

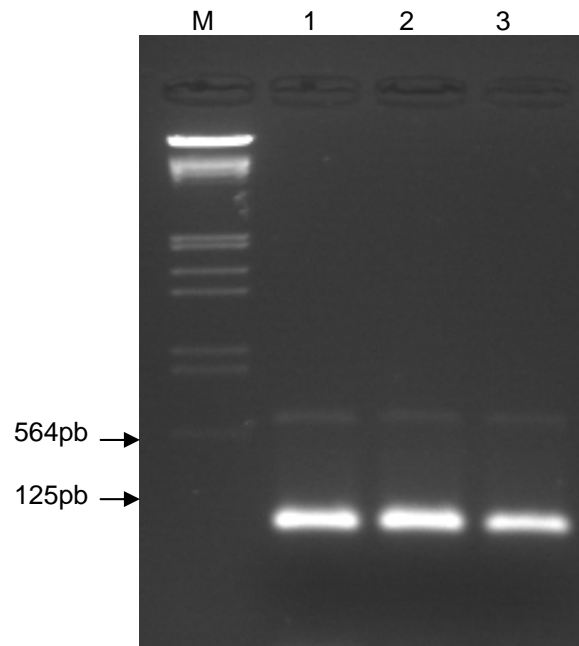


FIGURA 6. Digestão realizada com a enzima *EcoR I* no gel de agarose 3,0% corado com brometo de etídeo. A separação dos fragmentos gerados pela endonuclease de restrição não pôde ser visualizada no gel de agarose com a concentração em questão. (M) marcador de peso molecular λ *EcoR I/Hind III*. (1) 98012; (2) 98013; (3) 98014.

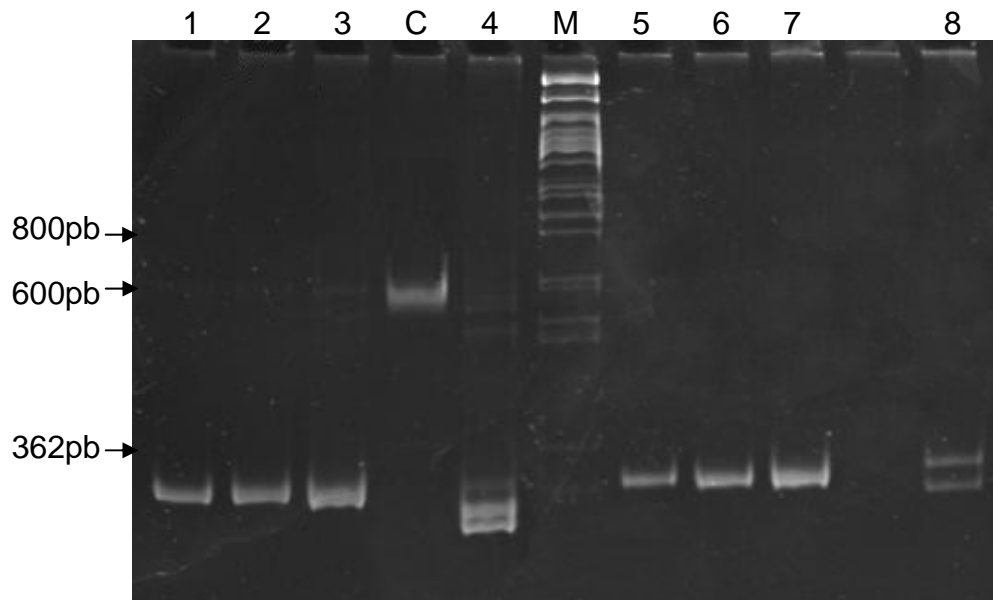


FIGURA 7. Perfil dos fragmentos de DNA da digestão realizada com a endonuclease de restrição *EcoR I* dos isolados em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo. (M) marcador tamanho λ *EcoR I/Hind III/Cla I*; (C) fragmento não digerido da região

ITS1, 5.8S e ITS2 (1) 98003; (2) BS15M2; (3) CS10-04; (4) BS16M1; (5) BS18M2; (6) BS52M1; (7) 98007; (8) NRRL5851.

5 DISCUSSÃO

Com base em todos os mecanismos já mencionados na revisão bibliográfica que constituem meios de diferenciação genética intraespecífica, também são considerados partes do genoma alguns elementos extracromossômicos como o DNA mitocondrial, plasmídeos e vírus de RNA. Esses elementos em conjunto podem chegar a representar considerável porcentagem da informação genética de uma célula, como no caso de *Saccharomyces cerevisiae* cujo conjunto chega a representar 15% da informação genética celular (ZAHA et al., 2003).

Além dos elementos provedores de variação já considerados, uma alteração que gerasse estresse ao organismo poderia promover a expressão de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica modificando o comportamento fisiológico e morfológico observado entre os isolados (GALAGAN et al., 2003).

O fluxo genético que ocorre inclusive através de mecanismos não-mendelianos pode constituir causa da existência de polimorfismos observados entre os isolados.

Segundo Espósito & Azevedo (2004) uma característica que distingue os fungos de outros eucariontes é o fato de não ser comum encontrar segmentos de DNA repetitivo, o que é freqüente em mamíferos, por exemplo. Em geral, apenas o DNA que origina o RNA ribossômico (rDNA) encontra-se repetido. E é por essa razão, somado ao fato das regiões ITS acumularem maior variabilidade genética, é que a análise dessa região pode proporcionar uma melhor compreensão sobre esse fitopatógeno e sua genética.

Nascimento (2004) em estudo realizado com os mesmos isolados, porém amplificando as regiões ITS isoladamente, observou no total dos isolados oito diferentes fragmentos quando digerindo os amplificados com *EcoR I*. No estudo em questão, o autor testou outras

17 endonucleases de restrição além da *EcoR I*. Comparando-se os dois trabalhos podemos observar diferenças no número de fragmentos identificáveis e visualizados no gel. O isolado 98003 apresentou dois fragmentos identificáveis a4 e a5, que possuem 310pb e 342pb respectivamente. No entanto, Nascimento (2004) observou além desses, um fragmento com 95pb. O mesmo resultado foi observado no isolado 98004. Já no isolado BS16M1, no qual o autor havia identificado um fragmento de 71pb e outro de 289pb, foi observado além desses o fragmento a5 com 342pb. No isolado NRRL5851 foi possível identificar os fragmentos a3 com 289pb e a5 com 342pb, mas não o fragmento de 71pb. Com o isolado 98018, de forma semelhante, não foi possível visualizar o fragmento de 71pb. No isolado 98033 o autor encontrou fragmentos de 37pb, 59pb e 375pb enquanto que neste estudo os fragmentos observados foram o a6 com 375pb e a2 com 95pb.

Segundo o autor, a região ITS1 não apresentou sítio de clivagem para a endonuclease *EcoR I*, sendo portanto esperado que apenas houvesse grande diferença entre os fragmentos gerados nesse e naquele estudo, considerando-se a inclusão da região 5.8S para o estudo atual.

6 CONCLUSÕES

- Os dados obtidos a partir do RFLP das regiões ITS 1, 5.8S e ITS2 dos isolados de *B. sorokiniana* revelaram a presença de polimorfismos intra-específicos;
- A presença de polimorfismo observada sugere que a técnica utilizada nesse estudo, pode caracterizar ferramenta útil na compreensão da biologia molecular e genética de *B. sorokiniana*, sendo necessários mais estudos sobre o assunto.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Afim de dar continuidade ao estudo:

- Deverão ser testadas mais endonucleases de restrição para posterior análise dos perfis de fragmentos de DNA dos isolados e com isso avaliar os polimorfismos entre os isolados.
- A realização de dendrogramas baseados no coeficiente de similaridade entre os isolados.
- Seja feito o seqüenciamento dos diferentes fragmentos encontrados.

REFERÊNCIAS

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

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

CABI Internacional. **Crop Protection Compendium**: Global Module. 2. ed. Wallingford, UK, 2000. 1 CD.

BIDARI, V. B.; GOVINDU, H. C. Germination and appressorial formation in *Helminthosporium sativum* on wheat leaf. **Current Research**, v. 8, p. 154-155. 1979.

COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO. **Indicações técnicas**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2005.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02 nov. 2009.

COSTA, M. C. M. **Genética de *Trichometasphaeria turcica* Lutt. I. Morfologia e Crescimento. II Compatibilidade sexual**. 1983. 91 fl. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1983.

CPVI - Convenção Internacional para a Proteção dos Vegetais. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <http://www.mre.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=2062&Itemid=59>. Acesso em: 02 nov. 2009.

CUNHA, G. R.(org); BACALTCHUK, B.; BISOTTO, V. **Trigo, 500 Anos no Brasil**. Brasília: Embrapa, 1999.

CUNHA, G. R.(org); BACALTCHUK, B. **Tecnologia para produzir trigo no Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Assembléia Legislativa; Passo Fundo: Embrapa Trigo, 2000. 404p.

CYMMIT- (México) Centro Internacional de Melhoramento de Trigo e Milho México. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://www.cimmyt.org/>>. Acesso em: 05 nov. 2009.

DEHNE, H. W.; OERKE, E. C. Investigations on the occurrence of *Cochliobolus sativus* on barley and wheat. v. 2. Infection, colonization, and damage of stem and leaves. **Journal of Plant Disease and Protection**, n. 92, p. 606-617. 1985.

DUCZEK, L. J., and JONES-FLORY, L. L. Relationship between common root, tillering and yield loss in spring wheat and barley. **Canadian journal of plant pathology**, n. 15, p. 153-158. 1994.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://embrapa.br/>>. Acesso em: 28 out. 2009.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. (org). **Fungos: uma introdução à biologia bioquímica e biotecnologia**. Rio Grande do Sul: Educs, 2004. 510 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1995. 220 p.

FERRON, P. Biological control of insect pests by entomogenous fungi. Annual **Review of Entomology**, Palo Alto, v. 23, p. 409-442, 1978.

FRANK, S. A. Models of plant pathogen coevolution. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v. 8, n. 6, 1992.

GALAGAN, E. J.; CALVO, S. E.; BORKOVICH, K. A.; SELKER, E. U. et al. The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. **Nature**, v. 422, p. 859-868, abr. 2003.

GHINI, R.; KIMARTI, H. **Resistência de fungos a fungicidas**. Brasília: Embrapa, 2002. p. 65-66.

GREY, W. E., and MATHRE, D. E. Reaction of spring barley to common root rot and its effects on yield component. **Canadian Journal of Plant Science**, n. 64, p. 245-253, 1984.

HANSEN, H. N. The dual phenomenon in perfect fungi. **Mycologia**, Bronx, v. 30, p. 442-455, 1938.

IBEAGHA, A. E.; HÜCKELHOVEN, R.; SCHÄFER, P.; SINGH, D. P.; KOGEL, K. H. Model Wheat Genotypes as tools to uncover effective defense mechanisms against the hemibiotrophic fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Phytopathology**, v. 95, n. 5, p. 528-532, jan, 2005.

INGRAM, D. S.; WILLIAMS, P. H. *Cochliobolus sativus*, A pathogen of wide host range. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 6. p. 113-122, 1988.

KLISTER, H. C.; MIAO, V. P. W. New modes of genetic change in filamentous fungi. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 30, p. 131-152, 1992.

KNUDSEN, I. B. M.; HOCKENHULL, J.; JENSEN, D. F. Biocontrol of seedling disease of barley and wheat caused by *Fusarium culmorum* and *Bipolaris sorokiniana*: effects on selected fungal antagonists on growth and yield components. **Plant Pathology**, n. 44, p. 467-477, 1995.

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

KUTCHER, H. R.; BAILEY, K. L.; ROSSNAGEL, B. G.; LEGGE, W. G. Heritability of common root rot and spot blotch resistance in barley. **Canadian Journal of Plant Pathology**, n. 16, p. 287-294, 1994.

LOUREIRO, M. F. Caracterização das estirpes por técnicas moleculares: o uso dos métodos de PCR e RAPD. In: HUNGRIA, M.; ARAÚJO, R. S. (coord.). **Manual de métodos empregados em estudo de microbiologia**. Brasília: Embrapa, 1994. p. 183-189.

LUDWIG, R. A. Toxin production by *Helminthosporium sativum* P. K. & B. And its significance in disease development. **Canadian Journal of Botany**, n. 35, p. 291-303, 1957.

MEHTA, Y. R. **Doenças do trigo e seu controle**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1978. 190p.

MERONUX, R. A.; PEPPER, E. H. Chlamidospore formation in conidia of *Helminthosporium sativum*. **Phytopathology**, St. Paul, v. 58, p. 866, 1968.

MICHELMORE, R. W.; HULBERT, S. H. Molecular markers for genetic analysis of phytopathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 25, p. 383-404, 1987.

MULLINS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase – catalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, New York, v. 155, p. 335-350, 1987.

MÜLLER, M. V. G. **O estudo da variabilidade morfológica e uso de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD na caracterização de isolados de *Bipolaris sorokiniana***, 2000. 135 fl. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em

Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

NASCIMENTO, E. J. M. **Caracterização molecular de *Bipolaris sorokiniana* usando análise de restrição das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal amplificado.** 2004. 105 fl. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

NAKAJIMA, H.; ISOMI, K.; HAMASAK, T.; ICHIONE, M. Sorokinianin: A novel phytotoxin produced by the phytopathogenic fungus *Bipolaris sorokiniana*. **Tetrahedron Letters**, v. 35, p. 9597-9600, dez. 1994.

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

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. C. Efeito do Tratamento de Sementes com Fungicidas sobre o Controle de Doenças na Parte Aérea do Trigo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 28, n. 5, p.515-520, 2003.

PRYCE, J.; EMILY, T.; CARVER, S.; GURR, J. The roles of cellulose enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, n. 55, p. 175-182, 1999.

REIS, E. M. Levantamento de plantas cultivadas, nativas e invasora hospedeiras de fungos causadores de podridões radiculares em cereais de inverno e em outras culturas. **Summa Phythologica**, Piracicaba, v. 8, p. 134-140, 1982a.

REIS, E. M.; CASA, R. T.; MEDEIROS, C. A. **Diagnose, Patometria e Controle de Doenças de Cereais de Inverno.** Londrina: E. S. Comunicação S/C Ltda, 2001a, 94 p.

REIS, E. M.; FORCELINE, C. A. Transmissão de *Bipolaris sorokiniana* de sementes para órgãos radiculares e aéreos do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 18, p. 76-81, 1993.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOEFFEL, S.; SHCARF, S. J.; HIGUGHI, G.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, Washigton, v. 239, p. 487-491, 1988.

SHARMA, R. C.; DUVEILLER, E.; AHMED, F.; ARUN, B.; BHANDARI, D.; BHATTA, M. R.; CHAND, R.; CHAURASIYA, P. C. P.; GHARTI, D. B.; HOSSAIN, M. H.; JOSHI, A. K.; MAHTO, B. N., MALAKER, P. K.; REZA, M. A.; RAHMAN, M.; SAMAD, M. A.; SHAHEED, M. A.; SIDDIQUE, A. B.; SINGH, A. K.; SINGH, K. P.; SINGH, R. N.; SINGH,

S. P. Helminthosporium leaf blight resistance and agronomic performance of wheat genotypes across warm regions of South Asia. **Plant Breeding**, n. 123, p. 520-524, 2004.

SHOEMAKER, R. A. Nomenclature of *Drechslera* and *Bipolaris*, grass parasites segregated from "Helminthosporium". **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v. 37, p. 879-886, 1959.

SILVA, V. M. **A regulação do Mercado brasileiro de trigo**. São Paulo: EDUSP, 1992.

STOLTE, R. E. **Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis* a fungicidas 'in vitro'**. 2006. 92 fl. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Fitopatologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

TINLIND, R. D.; MACNEILL, B.H. Parasexuality in plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, Ontário, v. 7, p. 147-170, 1969.

TINLIND, R.D. *Cochliobolus sativus*, a pathogen of wide host range. **Advances in Plant Pathology**, London, v. 6, p. 113-122, 1988.

TORNO, J. As principais doenças fúngicas. **Correio Agrícola**, São Paulo, v. 1, p. 12-15, 1992.

USDA – (Estados Unidos) United States Department of Agriculture. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://www.usdabrazil.org.br/>>. Acesso em: 05 out. 2009.

U. S. Wheat Associates - (Estados Unidos). **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <<http://www.uswheat.org/>>. Acesso em: 21 out. 2009.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics**. PCR- protocols a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990, p. 315-322.

VAN GINKEL, M.V.; RAJARAM, S. Breeding for resistance to spot blotch in wheat: Global perspective. Pages 162-170 In: Helminthosporium Blights of Wheat Spot Blotch and Tan Spot. E. DUVEILLER; H.J. DUBIN; J. REEVES; A. MCNAB, eds. International Maize and Wheat Improvement Centre, CIMMYT, Mexico, D.F, 1998.

VALIM-LIBRES, M. E.; VAN DER SAND, S. T.; PRESTES, A. et. al. Variação no aspecto cultural morfológico e virulência em isolados de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 22, p. 483-487, 1997.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P.. (org). **Biologia molecular básica**. 3 ed. Rio Grande do Sul: Mercado Aberto, 2003.

ZYLBERSZTAJN, D.; NEVES (Coord.), M. F.; ROSSI, R. M. (Coord.); FERRAZ, R. M. M.; CASTRO, L. T. ; MARINO, M. K.; MIZUMOTO, F. M.; CONEJERO, M. A.; FERREIRA, T. F.; ORATI, R. A. **Estratégias Para o Trigo no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2004, 224 p.

APÊNDICE

Apêndice 1 Meios de cultura e soluções utilizadas

1.1 Meio de cultura BDA

4g Infuso de batata

40g dextrose

15g Agar

Água destilada para completar 1000ml

1.2 Meio de cultura BD (Batata – dextrose)

200g batata

20g dextrose

Água destilada para completar 1000ml

1.3 Tampão de extração de DNA

200mM Tris-HCl pH 8,0

250mM NaCl

25mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pH 8,0

2% V/V dodecil sulfato de sódio (SDS)

1% β - mercaptoetanol

1.4 Clorofórmio-álcool isoamílico

24 volumes clorofórmio

1 volume álcool isoamílico

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

50ml água destilada

6ml Tris pH 8,8

12,5ml m-cresol

0,5ml β -mercaptoetanol

7,5ml NaOH 1N

Ajustar pH com pastilhas de NaOH

1.6 Tampão TAE 50X

242g de Tris

57,1ml ácido acético glacial

100ml EDTA 0,5M pH 8,0

1000ml de água destilada

1.7 Tampão TAE 1X

20ml TAE 50X

980ml de água destilada

1.8 Tampão TBE 5X

54g Tris base

27,5g ácido bórico

20ml EDTA 0,5M

1000ml água destilada

1.9 Tampão de amostra

0,025g de azul de bromofenol

3ml de glicerol

7ml de água destilada

1.10 Tampão PBS

10g NaCl

0,025g KCl

1,4g Na₂HPO₄

0,3g KH₂PO₄

Água para completar 1000ml

1.11 Acrilamida 30%

29g acrilamida

1g bis-acrilamida

100ml água destilada

1.12 Persulfato de amônio

1g persulfato de amônio

10ml água destilada

1.13 Gel de poliacrilamida 8%

8ml acrilamida 30%

6ml TBE 5X

280 μ l persulfato de amônio

32 μ l TEMED

16ml água destilada

1.14 Oligonucleotídeos iniciadores

Os oligonucleotídeos iniciadores foram dissolvidos em água milliQ (100ng/ μ l) e estocados à -20°C.

1.15 dNTPs (desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

Os dNTPs foram diluídos a uma concentração de 0,2mM em água milliQ e estocados À -20°C.

1.16 Proteinase K (fungal)

A enzima proteinase K foi dissolvida a uma concentração de 50mg/ml em Tris-HCl pH 8,0, 1-5mM acetato de cálcio, distribuída em alíquotas de 300 µl e estocada À -20°C.

1.17 Acetato de sódio

3M acetato de sódio

Água destilada para completar 1000ml

pH 5,2 ajustado com ácido acético glacial

Apêndice 2 Figura 1 e 2

Figura 1 Foto mostrando a variabilidade morfológica entre os isolados de *Bipolaris sorokiniana*.



Figura 2 Foto do microcultivo mostrando os conídios, estruturas reprodutivas utilizadas para identificação da espécie *Bipolaris sorokiniana*.