

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

**ESTUDO DA VIRULÊNCIA E VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E GENÉTICA
DO FUNGO *Bipolaris sorokiniana***

Alana Poloni
Bióloga – UFRGS

Março, 2008.

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

**ESTUDO DA VIRULÊNCIA E VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E GENÉTICA
DO FUNGO *Bipolaris sorokiniana***

Alana Poloni
Bióloga – UFRGS

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

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

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil
Março, 2008

Catálogo na Publicação
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

P778e

Poloni, Alana

Estudo da virulência e variabilidade fisiológica e genética do fungo
Bipolaris sorokiniana / Alana Poloni. – 2008.

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, 2008.

Orientação: Prof^a Sueli Teresinha. Van Der Sand

Co-orientação: Prof^a Ana Paula Guedes Frazzon

1. *Bipolaris sorokiniana*. 2. Fungos. I. Sand, Sueli Teresinha Van Der,
orient. II. Frazzon, Ana Paula Guedes, co-orient. III. Título.

CDU 579.22(043)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que tornaram possível a realização deste trabalho e de forma especial:

À professora Sueli Van Der Sand pela orientação, confiança, paciência, bom humor, amizade e apoio em todas as etapas deste trabalho e durante esses cinco anos de convivência.

À professora Ana Paula Guedes Frazzon pela co-orientação, incentivo, ensinamentos, sugestões e amizade.

Ao Igor S. Pessi pela preciosa ajuda na realização deste trabalho, pela amizade, momentos engraçados e por buscar a água.

Às colegas do maravilhoso Laboratório 209-B Carolina Poletto, Franciele Bucker, Jandora Poli, Juliana Mautone, Melissa Landell, Naiara Santestevan, Roberta Brito e Taís Letícia Bernardi, pela amizade, conversas, comilanças e risadas nas tardes do laboratório.

Aos amigos da Biologia pela valiosa amizade durante esses muitos anos.

Aos meus pais Marlene e Adriano, pelo amor, carinho e apoio.

À CAPES pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudos.

ESTUDO DA VIRULÊNCIA E VARIABILIDADE FISIOLÓGICA E GENÉTICA DO FUNGO *Bipolaris sorokiniana*

Autor: Alana Poloni

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

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

¹RESUMO

O fungo filamentosso *Bipolaris sorokiniana* é um fitopatógeno que causa moléstias em cereais de inverno, tais como a mancha marrom, a ponta preta dos grãos e a podridão comum da raiz. O controle deste fungo é dificultado pelo fato do mesmo apresentar uma ampla variabilidade morfológica, fisiológica e genética. Assim sendo, os objetivos deste trabalho foram estudar a variabilidade fisiológica, genética e virulência de isolados de *B. sorokiniana*. Foram utilizados 35 isolados de *B. sorokiniana* e um isolado de *B. orizae*, provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil e de outros países. Inicialmente foi realizado o agrupamento dos isolados, conforme as características morfológicas e a medida da taxa de crescimento dos mesmos, separando-os em grupos morfológicos. Os isolados foram avaliados quanto à atividade enzimática em meio sólido, a virulência em sementes e plântulas de trigo e perfil de proteínas totais em gel SDS-PAGE. Com os resultados obtidos, cinco grupos morfológicos foram formados, com diferenças na coloração micelial e crescimento. Foram encontradas variações entre os isolados quanto à atividade enzimática, sendo a esterase a enzima que apresentou os mais altos índices de atividade. Os resultados do ensaio de virulência mostraram diferenças na porcentagem de sementes e plântulas infectadas, entre isolados da mesma região geográfica e grupo morfológico. O perfil de proteínas totais apresentou uma variação no número e intensidade das bandas no gel, onde algumas destas podem ser características da espécie. Também foi avaliada a incompatibilidade vegetativa entre os isolados, a influência de diferentes meios de cultivo sobre a incompatibilidade e a análise eletroforética de proteínas totais dos isolados, quando crescidos isoladamente e em reações de incompatibilidade e compatibilidade. Dos 31 cruzamentos de incompatibilidade realizados, 18 mostraram-se totalmente incompatíveis e essas reações apresentaram alterações nos diferentes meios de cultivo utilizados, evidenciando a influência do substrato nesta reação. Alguns isolados quando crescidos em condição de pareamento mostraram bandas mais intensas na eletroforese, sugerindo que algumas proteínas poderiam ser expressas em níveis mais elevados durante o co-cultivo.

¹ Dissertação de mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (101p.) Março, 2008.

STUDY OF THE VIRULENCE AND PHYSIOLOGICAL AND GENETIC VARIABILITY OF THE FUNGUS *Bipolaris sorokiniana*

Author: Alana Poloni

Advisor: Dr. Sueli T. Van Der Sand

Coadviser: Prof. Dr. Ana Paula Guedes Frazzon

²ABSTRACT

Bipolaris sorokiniana is a phytopathogenic fungus that causes diseases in cereal crops, such as leaf spot disease, black point of the grain and common root rot. Because of its high morphological, physiological and genetic variability, the fungus control is a difficult task. The aim of this work was to study the physiological and genetic variability and the virulence of *B. sorokiniana* isolates. For this, 35 *B. sorokiniana* and one *B. orizae* isolates were used, proceeding from different geographic regions in Brazil and other countries. Initially, the isolates were evaluated for their morphological variability, considering mycelia color, sector formation, and growth rate. With this result the isolates were grouped by their morphologic characteristics. Extra-cellular enzymatic activity was analyzed in solid medium for all isolates, pathogenicity in wheat seeds and seedlings and analysis of total proteins by SDS-PAGE was done. Five morphological groups were formed with the results obtained with the morphological and growth characteristics. Variations among the isolates were found for enzymatic activity, and esterase was the enzyme that presented highest activity indices. The results obtained from infection of seeds and seedlings showed that isolates from the same geographic region and morphologic group had different degrees of virulence. The total protein profile presented by the isolates showed a variation in the bands number and intensity, where some of them can be characteristic of the specie. The vegetative incompatibility between the isolates was evaluated and the influences that different media culture in this reaction. The total proteins profile of the isolates was analyzed when the isolates were cultivated separately and in compatibility and incompatibility reactions. Thirty one crossings were realized and 18 out of them showed vegetative incompatibility, and these reactions had presented alterations with different media culture. This result strongly suggests the influence of the substratum in this reaction. The isolates when paired shown more intense protein bands in SDS-PAGE, suggesting that some proteins could be expressed in higher levels during co culture of the fungus.

² Master of Science dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (101 p.) March, 2008.

SUMÁRIO

RELAÇÃO DE TABELAS.....	ix
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	04
2.1 Histórico, aspectos gerais e importância econômica da cultura de trigo.....	04
2.2 Doenças fúngicas que atacam o trigo.....	09
2.3 O fungo <i>Bipolaris sorokiniana</i>	10
2.4 Moléstias, processo de infecção e epidemiologia.....	11
2.5 Métodos de controle de <i>B. sorokiniana</i>	15
2.6 Variabilidade do fungo <i>B. sorokiniana</i>	16
2.7 Anastomose de hifas e incompatibilidade vegetativa.....	21
2.8 Enzimas extracelulares.....	23
2.9 Padrões eletroforéticos de proteínas totais.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.1 Origem e obtenção dos isolados.....	30
3.2 Obtenção de colônias monoconidiais.....	31
3.3 Agrupamentos morfológicos.....	33
3.4 Taxa de crescimento micelial.....	33
3.5 Produção de enzimas extracelulares.....	34
3.5.1 Amilases.....	34
3.5.2 Celulases.....	34
3.5.3 Proteases.....	35
3.5.4 Pectinases.....	35
3.5.5 Esterases.....	35
3.5.6 Lipases.....	36
3.5.7 Quantificação da atividade enzimática.....	36
3.6 Avaliação da patogenicidade dos isolados.....	36
3.7 Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida.....	38
3.8 Avaliação da incompatibilidade vegetativa entre isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	39
3.9 Influência de diferentes meios de cultivo na manifestação da incompatibilidade.....	40
3.10 Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 Grupos morfológicos e taxa de crescimento.....	42
4.2 Atividade enzimática.....	50
4.3 Patogenicidade dos isolados a sementes e plântulas de trigo.....	61
4.4 Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida.....	68
4.5 Avaliação da incompatibilidade vegetativa entre isolados de <i>Bipolaris sorokiniana</i>	71

4.6 Influência de diferentes meios de cultivo na manifestação da incompatibilidade.....	76
5. CONCLUSÕES.....	80
6. REFERÊNCIAS.....	81
7. APÊNDICES.....	92
8. VITA.....	101

RELAÇÃO DE TABELAS

Tabela 1	Isolados utilizados no estudo, origem geográfica e agrupamento segundo as regiões ITS 1 e ITS2 do DNA ribossomal.....	32
Tabela 2	Distribuição dos grupos morfológicos formados pelos trinta e seis isolados de <i>B. sorokiniana</i>	44
Tabela 3	Virulência de isolados de <i>B. sorokiniana</i> em sementes e plântulas de trigo.....	67
Tabela 4	Isolados de <i>B. sorokiniana</i> cruzamentos conforme os agrupamentos das regiões ITS e resultados dos testes de incompatibilidade.....	72
Tabela 5	Cruzamentos de isolados de <i>B. sorokiniana</i> nos diferentes meios de cultivo utilizados.....	77

RELAÇÃO DE FIGURAS

Figura 1	Isolados representando os cinco agrupamentos morfológicos de <i>B. sorokiniana</i>	43
Figura 2	Curva de crescimento dos isolados do Grupo I quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.....	48
Figura 3	Curva de crescimento dos isolados do Grupo II quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.....	48
Figura 4	Curva de crescimento dos isolados do Grupo III quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.....	49
Figura 5	Curva de crescimento dos isolados do Grupo IV quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.....	49
Figura 6	Curva de crescimento dos isolados do Grupo V quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.....	50
Figura 7	Halo produzidos pela hidrólise de substratos pelas enzimas.....	51
Figura 8	Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de <i>B. sorokiniana</i> para atividade de amilases.....	52
Figura 9	Relação halo/colônia dos isolados de <i>B. sorokiniana</i> para atividade de carboximetilcelulases.....	53
Figura 10	Relação halo/colônia dos isolados de <i>B. sorokiniana</i> para atividade de proteases.....	54
Figura 11	Relação halo/colônia dos isolados de <i>B. sorokiniana</i> para atividade de pectinases.....	55
Figura 12	Relação halo/colônia dos isolados de <i>B. sorokiniana</i> para atividade de esterases.....	56
Figura 13	Porcentagem de isolados com produção em cada teste.....	58

Figura 14	Médias da relação H/C de todos os isolados para cada teste.....	58
Figura 15	Médias da relação H/C de cada isolado em todos os testes.....	59
Figura 16	Sintomas apresentados por sementes e plântulas.....	62
Figura 17	Perfis protéicos dos isolados de <i>B. sorokiniana</i>	69
Figura 18	Avaliação da incompatibilidade vegetativa entre isolados.....	71
Figura 19	Anastomoses de hifas entre isolados de <i>B. sorokiniana</i>	73
Figura 20	Perfis protéicos dos isolados de <i>B. sorokiniana</i> crescidos isoladamente e cultivados em co-cultivo com outros isolados do mesmo grupo ITS.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

cm: Centímetro

DNA: Ácido desoxirribonucléico

mL: Mililitro

µL: Microlitro

µm: Micrômetro

pH: Logaritmo decimal do inverso da atividade de íons hidrogênio numa solução

KDa; Kilo dalton

1. INTRODUÇÃO

O trigo é um dos principais constituintes da dieta humana, sendo importante tanto na produção de alimentos como na geração de empregos na agricultura, indústria e comércio. No entanto, o trigo que é produzido no Brasil não é suficiente para suprir à demanda interna, sendo necessária a importação. Um dos fatores responsáveis pela baixa produção é a ocorrência de doenças fúngicas, que são favorecidas pelo clima quente e úmido do país. Dentre essas, destacam-se a mancha marrom, a ponta preta dos grãos e a podridão comum da raiz causada pelo fitopatógeno *Bipolaris sorokiniana*. Este fungo apresenta uma elevada variabilidade morfológica e fisiológica, o que dificulta seu diagnóstico e o controle das moléstias. Aliado a isso, o período necessário para o desenvolvimento das estruturas reprodutivas em laboratório é relativamente longo.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para o estudo da variabilidade genética em fungos fitopatogênicos. A incompatibilidade vegetativa é uma técnica simples e rápida, baseada na formação ou não de heterocários estáveis entre

fungos de constituição genética similares. Outro método bastante utilizado é a produção de enzimas extracelulares com a capacidade de degradar diversos substratos. A taxa de crescimento micelial, assim como a atividade enzimática, pode fornecer informações sobre a variabilidade fisiológica. O uso de técnicas eletroforéticas como o SDS-PAGE pode ser mais um recurso no estudo da variabilidade em fungos, sendo utilizado para a separação de enzimas e outras proteínas e permitindo análises qualitativas e quantitativas. Aliado a tais métodos, a avaliação da virulência em plantas traz informações importantes sobre a variabilidade patogênica em fungos. Assim, estudos da variabilidade genética, fisiológica e patogênica deste fungo são de grande importância, pois podem fornecer valiosas informações de como o patógeno interage com a planta hospedeira, permitindo a identificação de isolados hipoavirulentos ou avirulentos, os quais poderiam contribuir para estratégias de controle das moléstias. Além disso, tais informações contribuem para o desenvolvimento de outras técnicas que permitam a identificação molecular do fungo, facilitando a identificação ainda na semente, que é a principal forma de difusão da moléstia.

Desta forma, os objetivos deste estudo foram:

- Analisar a ocorrência de incompatibilidade vegetativa entre os isolados, verificando a influência de diferentes meios de cultivo para a manifestação da incompatibilidade;

- Avaliar a morfologia colonial, a taxa de crescimento e a atividade enzimática dos isolados, buscando relacionar estas características à patogenicidade;
- Obter e comparar os perfis protéicos dos diferentes isolados quando crescidos isoladamente e quando confrontados no teste de incompatibilidade vegetativa;
- Avaliar a virulência de *B. sorokiniana* em sementes e plântulas de trigo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico, aspectos gerais e importância econômica da cultura de trigo

O trigo é um cereal de inverno originado da Ásia, que foi introduzido na Índia, na China e na Europa há aproximadamente 500 mil anos A.C. Dados arqueológicos sugerem que este cereal foi o segundo grão cultivado, permitindo que a espécie humana abandonasse a caça e a pesca e se fixasse à terra, formando cidades e povoados (Cunha et al., 1999). O trigo foi introduzido no Brasil em 1634 por imigrantes portugueses que vieram colonizar a Capitania de São Vicente (Osório, 1992). Seu cultivo de forma mais sistematizada iniciou por volta de 1720, com a chegada ao sul do país de colonos açorianos, que implantaram esta lavoura no estado do Rio Grande do Sul (Alves, 1991). No entanto, somente no século XIX, com a imigração européia, ocorreu o aumento da produção de trigo, com o conhecimento das técnicas de cultivo de trigo trazidas por estes imigrantes e o aumento da demanda de alimentos derivados deste cereal (Osório, 1992).

As seleções e criações de novos cultivares no país tiveram início em 1919. Desde então, este cereal tem sido a cultura de inverno mais importante no sul do Brasil. Os estados que mais produzem trigo no Brasil, por ordem de produção, são: Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, São Paulo, Minas Gerais, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Bahia (Sousa, 1997). Atualmente, o trigo brasileiro é conhecido por apresentar os melhores genes para tolerância à acidez do solo e resistência à ferrugem da folha e outras doenças fúngicas (Cunha et al., 1999).

O trigo é uma planta herbácea, monocotiledônea, fasciculada, com a parte aérea formada por um conjunto de colmos, a sua inflorescência é terminal do tipo espiga e o fruto é do tipo cariopse (Osório, 1992). Pertence à família Graminae e ao gênero *Triticum*, possuindo diversas espécies. Para a classificação das diferentes espécies de trigo, foram desenvolvidos trabalhos baseados no número de cromossomos da planta, que morfologicamente podem ser perfeitamente distinguidos. Foram encontradas 15 espécies de trigo que se dividem em três grupos: o diplóide (14 cromossomos em dois grupos), o tetraplóide (28 cromossomos em quatro grupos) e o hexaplóide (42 cromossomos em seis grupos). As espécies de maior interesse comercial são *Triticum aestivum* L. (trigo comum ou farinhento), usado na fabricação de pães, bolos, biscoitos e produtos de confeitaria; *Triticum compactum* Host, usado em produtos de confeitaria; e *Triticum durum* (trigo duro) usado no preparo de massas alimentícias (Germani et al. 1998). A espécie *T. aestivum* L. corresponde a cerca de 90% da área cultivada e 94% da produção de grãos colhidos no mundo, tendo a maior

média mundial de rendimento em grãos. China, Índia e Turquia são os mais importantes produtores deste tipo de trigo. *T. durum* L., também chamado de cristalino ou macarroneiro, é utilizado para fabricar macarrão tipo italiano e representa cerca de 9% da área cultivada e 5% da produção mundial de grãos. Sua produção está concentrada no Oriente Médio, Índia, Mediterrâneo, Oeste da Ásia, Norte da África, Argentina, Chile, Rússia, México, Estados Unidos, Itália, Espanha e Canadá (CIMMYT, 2008). O rendimento médio dos grãos de *T. durum* é mais baixo do que o de *T. aestivum*, devido a tendência de cultivá-lo em climas semi-áridos. Entretanto, os cultivares de *T. durum* podem ser plantados em condições de irrigação, tendo, em geral, melhores preços no comércio internacional do que os melhores trigos farinhentos (Hanson et al., 1985).

No Brasil, a Instrução Normativa Número 1, de 27 de janeiro de 1999, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MAA), denominada “Norma de Identidade e Qualidade do Trigo”, estabelece a classificação e tipificação do trigo. Esta instrução classifica o trigo em 4 classes: o trigo Brando, destinado à fabricação de bolachas, biscoitos, produtos de confeitaria, pizzas, massa caseira e ração; o trigo Pão, usado na panificação, massas alimentícias e em mesclas com o trigo Brando; o trigo Melhorador, destinado à fabricação de massas alimentícias, biscoitos e em mesclas com o trigo Brando para panificação; e o trigo para outros usos, geralmente sendo aquele com grãos germinados, usados para ração. A tipificação do trigo varia de 1 a 3, conforme o grau de umidade, impurezas e danificação dos grãos (Cunha e Bacaltchuk, 2000). Este cereal é o mais comercializado do mundo, ocupando aproximadamente 17% das terras cultivadas

e é, também, a segunda cultura de grãos em produção, sendo sobrepujado apenas pelo milho (Indicações Técnicas da Comissão Sul-brasileira de pesquisa de Trigo, 2005).

O Brasil consome anualmente cerca de 10,6 milhões de toneladas de trigo, mas não conseguiu produzir nos últimos anos o suficiente para suprir a demanda interna, tendo que importar trigo para suprir o consumo. A produção brasileira de trigo foi de 1,66 milhões de toneladas, na safra 2000/01, 3,25 milhões de toneladas na safra 2001/02, 2,94 milhões de toneladas na safra 2002/03 e 6,03 milhões de toneladas 2003/2004. Em contrapartida, o consumo interno nestes períodos, respectivamente, foi de 9,324; 10,193; 9,940; 10,151 e 10,310 milhões de toneladas (Indicações Técnicas da Comissão Sul-brasileira de pesquisa de Trigo, 2005). A estimativa da produção de trigo na atual safra (2007/08) é de 3.831,4 mil toneladas, superior à safra anterior (2006/07) em 71,5% (1.597,7 mil toneladas). O referido incremento deve-se à recuperação da produtividade, já que na safra anterior essa cultura foi bastante castigada com a estiagem, com a geada e o com excesso de chuva na colheita. No Rio Grande do Sul, a partir da segunda quinzena de setembro, ocorreu chuva em excesso, acompanhada de ventos fortes e granizo em algumas localidades, perdurando esse quadro durante todo o mês de outubro. Com essa situação, ocorreu o aparecimento de doenças fungicas em larga escala, afetando a produtividade e a qualidade do grão que se encontravam no estágio de maturação e colheita (CONAB, 2008).

Estima-se que em 2020 a demanda seja 40% maior daquela que é necessária atualmente (CIMMYT, 2008). Segundo dados mundiais das últimas cinco safras a China (com 14,5% da produção mundial), União Européia e os EUA, aparecem como os maiores produtores de trigo e também com os melhores índices de produtividade. A Argentina é um dos maiores exportadores de trigo a nível mundial (7,346 milhões de toneladas), sobrepujada na ordem crescente, em quantidades exportadas, pela Austrália (15,096 milhões de toneladas), pelo Canadá (15,526 milhões de toneladas) e pelos Estados Unidos (32,287 milhões de toneladas), no ano agrícola de 2003/4.

A produção brasileira de trigo tem sido insuficiente nas últimas décadas e, mesmo que tenha apresentado uma pequena recuperação recente, representa apenas 1% da produção mundial. As perdas na produção de trigo são decorrentes da redução das áreas cultivadas, ocasionada pela baixa cotação do produto no mercado interno e pela dificuldade de comercialização nas últimas safras, e pela redução na produtividade dos grãos, devido às adversidades climáticas que afetam os estados produtores (IBGE, 2005). As condições climáticas estão relacionadas à precipitação pluvial e temperatura que, pela ocorrência de chuvas frequentes e altas temperaturas, contribuem para o desenvolvimento de doenças fúngicas, as quais são fatores limitantes tanto para a produção como para a qualidade dos grãos colhidos (Reis e Casa, 1998).

2.2 Doenças fúngicas que atacam o trigo

Os fungos são os principais microrganismos presentes em sementes armazenadas e constituem a causa central da deterioração e perdas durante o armazenamento. Os danos causados por fungos (odor, descoloração, produção de toxinas, diminuição de peso, aquecimento, mudanças bioquímicas e redução do poder germinativo da semente) afetam substancialmente a qualidade, contribuindo para a desvalorização do cereal e dos seus subprodutos. Os fungos que comumente atacam as sementes de trigo são classificados como de campo e de armazenamento. Os primeiros acometem a semente antes da colheita, durante o seu período de crescimento e maturação, requerendo para o seu crescimento 90-95% de umidade relativa. Portanto, não se desenvolvem com o reduzido grau de umidade das sementes e da temperatura durante o armazenamento, podendo, no entanto, sobreviver durante anos em sementes armazenadas (Wetzel et al., 1983). Depois de colhidas e armazenadas, as sementes estão sujeitas à invasão de fungos de armazenamento, principalmente dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*, que se desenvolvem em sementes com graus de umidade entre 65-90% UR. Geralmente os fungos do armazenamento não infestam as sementes antes da colheita, sendo encontrados em sementes recém-colhidas numa porcentagem muito baixa. Uma de suas características é justamente o seu alto poder de propagação, pois embora presentes no campo em porcentagem baixíssima, se multiplicam rapidamente em poucos dias, desde que encontrem condições de ambiente favorável (Wetzel et al., 1983).

As doenças de maior importância, segundo Picinini & Fernandes (2003), pelos danos que podem causar na cultura do trigo, são o oídio, causado por *Oidium monilioides* (Nees) Link (teleomórfico *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (Dc.) E.O. Speer); as ferrugens da folha e do colmo, causadas, respectivamente, por *Puccinia triticina* Rob. ex. Desm e *Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici* Heriks. & Henn.; a mancha da gluma, causada por *Stagonospora nodorum* (Berk.) Cast. & Germ. (teleomórfico *Phaeosphaeria nodorum*); a mancha amarela, causada por *Drechslera tritici-repentis* Died. Shoemaker (teleomórfico *Pyrenophora tritici-repentis* (Died.) Drechs.); a giberela, causada por *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomórfico *Gibberella zeae* (Schw.) Petch) e a mancha marrom causada por *Bipolaris sorokiniana* (Sacc. In. Sorok) Shoem. (teleomórfico *Cochliobolus sativus* (Ito & Kurib) Dreschs. Ex Dastur.).

2.3 O fungo *Bipolaris sorokiniana*

O gênero *Bipolaris* contém aproximadamente 45 espécies, das quais a grande maioria é parasita de plantas, como *Bipolaris oryzae* (arroz) e *Bipolaris sacchari* (cana-de-açúcar). Algumas espécies, como *Bipolaris australiensis*, *Bipolaris hawaiiensis* e *Bipolaris spicifera*, são patogênicas ao homem.

Bipolaris sorokiniana (Sacc.in Sorok) Shoemaker, 1959; (teleomorfo): *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsl. Ex dastur, pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, família Dematiaceae (Alexopoulos & Mims, 1985). É um fungo filamentoso que apresenta conidióforos isolados ou em grupos, retos ou flexuosos,

algumas vezes geniculados, cor palha a marrom-escuros, septados, medindo entre 100-400 μm x 6-8 μm ou, segundo Ellis (1971), acima de 220 μm de comprimento e 6-10 μm de espessura. Os conídios jovens são sub-hialinos, tornando-se amarelo-esverdeados a marrom-oliváceos escuros, apresentando formas curvadas ou, freqüentemente, são retos, fusiformes ou ligeiramente elipsóides quando em meio de cultura. Os conídios germinam por um ou ambos os pólos, o primeiro septo é produzido delimitando 1/3 basal do conídio e o hilo é externo, porém truncado (Muchovej et al., 1988).

Na fase sexual ou teleomórfica, o fungo passa a ser um ascomiceto denominado *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi) Drechsler ex Dastur. Este apresenta pseudotécios pretos, globosos, com 300-400 μm de diâmetro e rostro ereto com 50-200 μm de comprimento. Os ascos são clavados, medindo de 20-45 x 120-250 μm e contendo de 4 a 8 ascósporos encurvados em helicóide. Estes são hialinos, filiformes, afilados nas extremidades e medem 6-9 x 160-360 μm (Ellis, 1971; Mehta, 1978). A fase teleomórfica é de rara ocorrência na natureza e foi encontrada apenas na Zâmbia em 1988 (Kumar et al., 2002). Contudo, esta forma pode ser obtida em laboratório na presença de material vegetal e outras condições especiais de cultivo (Ingram & Willians, 1988).

2.4 Moléstias, processo de infecção e epidemiologia

B. sorokiniana é um patógeno de especial importância nas culturas do trigo e da cevada, causando moléstias que recebem diferentes denominações de acordo com o órgão da planta que é afetado (Reis, 1982). Também são relatados

como cultivares suscetíveis a este fitopatógeno triticales, sorgo, festuca, azevém, centeio, aveia amarela, branca e preta (Tinline, 1988).

As moléstias causadas por *B. sorokiniana* ocorrem em qualquer fase de desenvolvimento da cultura, desde o estabelecimento desta até a sua colheita. Quando o fungo ataca os órgãos verdes da planta, interferindo nos processos fotossintéticos, a moléstia é denominada mancha marrom. Primeiramente, esta doença se manifesta em plúmulas oriundas de sementes infectadas. O fungo cresce a partir da semente e coloniza o coleóptilo, sobre o qual aparecem lesões castanho-escuras. Caso o micélio penetre e se desenvolva no interior do coleóptilo, as manchas poderão ser observadas sobre a plúmula que emergir. Inicialmente, surgem lesões necróticas pardas, nas primeiras folhas, em virtude da transmissão a partir das sementes. Nas demais folhas, as lesões podem ser ovaladas a oblongas, com bordos definidos que variam em tamanho, podendo crescer até coalescerem, formando grandes manchas com 0,5 a 1,0 cm de comprimento e com coloração variável, desde cinza claro a negras, que cobrem largas áreas do limbo foliar. As folhas ficam crestadas, secas e morrem prematuramente (Reis & Casa, 1998). Nas espigas, as lesões nas glumas têm centro claro e halo escuro. Os grãos que se formam nas espigas infectadas podem expor o sintoma denominado ponta preta. Esse sintoma nem sempre se manifesta, o que torna as sementes aparentemente sadias (Reis & Forcelini, 1993). Lesões de cor castanho-escuro aparecem nos nós e, às vezes, nos entrenós, pela presença de conídios do fungo, sendo a doença denominada carvão-do-nó. Tais lesões podem levar ao estrangulamento, com consequente

quebra e morte da planta. O fungo pode infectar também os órgãos subterrâneos da planta, interferindo nos processos de absorção de água e nutrientes, moléstia esta que recebe o nome de podridão comum da raiz (Reis & Casa, 1998). Os sintomas mais comuns são as descolorações do tecido radicular, que, com o tempo, torna-se acinzentado. Plantas adultas doentes apresentam lesões pequenas, ovais e de coloração marrom nas raízes, nas bainhas das folhas inferiores ou nos internódios da coroa da planta, próximo à superfície do solo (Reis & Casa, 1998). Os danos na planta podem ultrapassar a 30 % e a partir dos 53 dias após a emergência, estes podem ser ainda maiores. A mancha marrom é considerada uma doença de grande impacto econômico, com elevada incidência e transmissão em sementes, podendo variar de 60 a 90% (CABI, 2000). Levantamentos sanitários de sementes comercializadas no país têm revelado a presença constante de *B. sorokiniana*, com percentuais variando conforme o ano, o local e o cultivar, podendo chegar a 100% (Forcelini, 1995).

B. sorokiniana produz toxinas sesquiterpênicas sintetizadas a partir do farnesol. O pré-helmentosporol é o composto mais abundante e ativo, exercendo efeito inibitório sobre a ATPase e possuindo propriedades anfipáticas (Kumar et al, 2002). Outra toxina, o helmentosporol, afeta a permeabilidade da membrana, fosforilação oxidativa, fotofosforilação e bombeamento de prótons através da membrana plasmática (Kumar et al, 2002). Um outro composto, denominado sorokianina, foi isolado de filtrados fúngicos, apresentando efeitos inibitórios sobre a germinação de sementes de aveia (Nakajima, 1994).

De acordo com Prates & Fernandes (2001), quando a temperatura fica entre 23 e 30 °C, a taxa de expansão das lesões causadas por *B. sorokiniana* é maior, fato que justifica a doença ser mais freqüente em regiões de clima tropical e subtropical. Ensaio realizado por Luz & Bergstrom (1986) mostrou que, para cultivares suscetíveis, a temperatura ótima está entre 20 e 28 °C e para cultivares moderadamente resistentes e resistentes 28 °C. Quando o fungo infecta a semente no momento em que ela germina, o parasita sai do estado de dormência. Assim, o micélio, que se encontrava no endosperma, cresce até a superfície da cariopse, atinge o coleóptilo e alcança a extremidade, fora do solo, onde passa a esporular. Também pode ocorrer a infecção da plúmula pela penetração do micélio no coleóptilo, o que determina o aparecimento de lesões na bainha após sua emergência (Reis & Casa, 1998). Havendo condições favoráveis ao estabelecimento da infecção pode ocorrer uma epidemia no início do estágio de desenvolvimento do trigo. A esporulação do fungo sobre as lesões pode disseminá-lo pelo vento sob condições de clima seco, atingindo outras folhas na mesma planta ou em vizinhas, sendo responsável pelos ciclos secundários da doença em órgãos aéreos.

As fontes de inóculo primário são as sementes, os restos culturais infectados, as plantas voluntárias, os hospedeiros secundários e os conídios livres dormentes no solo (Reis & Casa, 1998). No processo de infecção, o fungo passa por uma fase biotrófica de crescimento sobre o hospedeiro, caracterizada pela penetração da cutícula e parede celular, seguida do desenvolvimento de hifas dentro das células da epiderme. Na fase necrotrófica ocorre a inversão do

mesófilo e morte das células (Kumar et al., 2002). As células internas de alguns conídios que caem no solo se transformam em clamidósporos, auxiliando na sobrevivência do patógeno diretamente no solo por longos períodos de tempo, o que consiste em uma vantagem em relação a outros fitopatógenos que não sobrevivem sem a presença de restos culturais (Meronux & Pepper, 1968).

2.5 Métodos de controle de *B. sorokiniana*

Os principais métodos de controle das doenças causadas por *B. sorokiniana* são a rotação de culturas, eliminação de restos culturais, uso de cultivares resistentes e fungicidas. Logo após seu lançamento, os novos cultivares apresentam maior produtividade, já que ainda possuem resistência a doenças. Porém, com o passar dos anos, novas raças e variantes de fungos surgem quebrando a resistência e reduzindo a produtividade (Cunha & Trombini, 1999).

Os tratamentos de sementes com fungicidas eficientes, associados a estratégias como a rotação de culturas e o uso de cultivares resistentes, podem reduzir o número de aplicações de fungicidas no controle de doenças foliares em trigo (Picinini & Fernandes, 2003). Lasca et al. (2001) testaram a eficiência de vinte fungicidas no controle de *B. sorokiniana* e *Pyricularia grisea* em sementes de trigo, sendo que os fungicidas iprodione e carbendazin foram os mais eficientes. Fungicidas são bastante utilizados no controle de fitopatógenos devido a sua facilidade de aplicação e resultados imediatos. No entanto, o uso contínuo destes produtos pode aumentar as chances de resistência de fungos fitopatogênicos. Extensas áreas tratadas com o mesmo ingrediente ativo aumentam a pressão de

seleção e, além disso, quanto menor o tempo de geração do patógeno, mais freqüente é a necessidade de exposição ao fungicida e maior o risco de resistência (Ghini & Kimarti, 2002).

De acordo com Reis & Casa (1998) um plantio com uma espécie vegetal não suscetível é suficiente para reduzir a incidência de *B. sorokiniana*, pois foi demonstrado que a esporulação do fungo acompanha a curva de decomposição dos restos culturais e não é detectada após 17 meses.

Alguns estudos recentes buscam a utilização de métodos alternativos ao uso de fungicidas. Um exemplo é o uso de extratos vegetais, demonstrado em estudos realizados por Rodriguez et al. (2006) com a planta medicinal *Ocimum gratissimum* e por Salgado et al. (2003) com espécies de *Eucalyptus*. Da mesma forma, o controle biológico surge como uma estratégia interessante, por ser uma medida atóxica e não provocar desequilíbrios ambientais. Trabalhos utilizando microrganismos como *Stenotrophomonas maltophilia* (Zhang & Yuen, 1999), *Pseudomonas* sp. (Hodges et al., 1994), *Bacillus* sp. (Czaczky et al., 2000) e *Trichoderma hamatum* (Dall Bello et al., 1997) mostraram resultados satisfatórios no controle de *B. sorokiniana*.

2.6 Variabilidade do fungo *B. sorokiniana*

Espécies fúngicas patogênicas de plantas ou animais exibem variações em importantes aspectos, como na morfologia, síntese de metabólitos secundários e virulência. Azevedo (1976) salienta que os mecanismos que conferem variabilidade em fungos fitopatogênicos são a mutação, a parassexualidade, a

heterocariose e a recombinação somática em fungos imperfeitos e a recombinação sexual em fungos de outras classes. A variabilidade na morfologia impede a identificação do patógeno, enquanto a variabilidade fisiológica dificulta a avaliação da patogenicidade. A correta identificação das espécies é uma informação necessária para entender a relação patógeno-hospedeiro e possibilitar que medidas de controle sejam tomadas.

Durante a interação patogênica entre fungos e plantas são expressos diversos genes, os quais estão envolvidos na síntese de enzimas de degradação da parede vegetal do hospedeiro e estruturas de infecção. Tais genes podem ser expressos durante as fases de contato inicial com a planta ou na fase de necrose (Kahmann & Basse, 2001). As populações de fitopatógenos são notoriamente sensíveis ao genótipo do hospedeiro e as variações no meio ambiente. Populações de plantas são com frequência geneticamente polimórficas para a resistência a patógenos, mas estes são polimórficos para os genes de virulência e podem quebrar a resistência do hospedeiro. Esses dados sugerem que os polimorfismos planta-patógeno são mantidos por um ciclo contínuo de coevolução entre as populações, combinado com a migração ocasional de genes de virulência e resistência oriundos de população distante (Frank, 1992). Alguns fungos possuem cromossomos supranumerários que contribuem para a variação na patogenicidade, pois carregam genes de virulência. Também já foram observados elementos transponíveis, que podem ser transmitidos entre núcleos de um heterocário e fatores genéticos citoplasmáticos, RNAs citoplasmáticos e

plasmídeos, que podem ser transferidos para diferentes linhagens por mecanismos não mendelianos (Klister & Miao, 1992)

As características morfológicas, fisiológicas e genéticas de *B. sorokiniana* já foram abordadas em muitos estudos. Os estudos com este fungo iniciaram com Christensen (1925), que verificou a presença de grandes diferenças morfológicas onde 37 fenótipos de *B. sorokiniana* foram observados em meio de cultura. Hansen (1938) observou a instabilidade cultural de fungos fitopatogênicos imperfeitos isolados da natureza, propondo a existência de dois estados morfológicos: um estado conidial, com abundante produção de conídios e outro micelial, com produção de poucos ou nenhum conídio e abundantes hifas aéreas. Tal fenômeno foi atribuído à variação na proporção de núcleos do tipo micelial e do tipo conidial no heterocário.

Tinline (1961) observou grande variabilidade em *C. sativus*, com relação à cor dos esporos, pigmentação do micélio, virulência, esporulação e outras características em meio de cultura. O autor sugeriu três mecanismos para aumentar a variabilidade: mutação, heterocariose e hibridização. Guseva et al. (1979) salientaram que a variabilidade pode ser responsável pela capacidade infectiva do fungo, pois suplanta a resistência do hospedeiro. Mehta (1981) estudou a patogenicidade de 96 isolados monoconidiais de *Helminthosporium sativum*, oriundos de 41 municípios e 51 cultivares. O autor encontrou 32 raças diferentes, sendo que 23 foram detectadas no Paraná, 4 em São Paulo, 3 no Rio Grande do Sul, 1 no Mato Grosso e 1 no Distrito Federal.

Viegas et al. (1992) relataram variabilidade quanto ao crescimento e morfologia de 60 isolados de *C. sativus*, cultivados em diferentes meios de cultura e concluíram que as diferenças estavam relacionadas ao meio e características de cada isolado. Valim-Labres et al. (1997) e Oliveira et al. (1998) investigaram a variação morfológica e virulência de *B. sorokiniana*, onde os autores encontraram variações quanto a essas características e não observaram relação entre a variabilidade morfológica e virulência dos isolados. Berbee et al. (1999) avaliaram a distribuição filogenética de espécies dos gêneros *Cochliobolus*, *Bipolaris* e *Curvularia*, utilizando as regiões do espaço transcrito interno ITS e o gene *gpd*, que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, obtendo 2 grupos filogenéticos. Almgren et al. (1999) estudaram a relação entre infecções em folhas e raízes por diferentes isolados de *B. sorokiniana* em 11 cultivares de cevada, onde taxas de infecção mais elevadas foram observadas nas folhas do que nas raízes foram encontradas, sendo que tais reações foram diferenciadas conforme o isolado utilizado.

Duveiller et al. (2000) estudaram a patogenicidade de 27 isolados de *B. sorokiniana* da cidade do México, encontrando resultados que revelaram a alta variação de infecções causadas por *B. sorokiniana* e que estas eram altamente influenciadas por fatores ambientais. Zhong & Steffenson (2001) estudaram a diversidade genética pela técnica de *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) e patogenicidade de 22 isolados de *B. sorokiniana*, encontrando 3 patotipos. Destes, o patotipo 2 era extremamente virulento e ocorria apenas em Dakota do Norte (USA). Quanto à diversidade genética, os autores verificaram que

muitos isolados oriundos de diferentes regiões geográficas agruparam-se em um mesmo grupo pela técnica de AFLP, sugerindo que haveria ocorrido a migração destes patógenos por estas regiões.

Weikert-Oliveira (2002) estudou a variabilidade de vinte amostras de 4 espécies de fungos, dentre as quais sete isolados de *Bipolaris sorokiniana*, causadores de helmintosporiose em cereais, pelas técnicas de PCR-RFLP e RAPD. A referida autora encontrou alto polimorfismo inter e intraespecífico. Os perfis de RAPD obtidos revelaram ausência de correlação entre os fatores climáticos e a origem geográfica dos isolados de *B. sorokiniana*. Arabi & Jawhar (2004) analisaram a virulência de isolados de *Cochliobolus sativus* utilizando 10 diferentes genótipos de cevada, encontrando alta variação entre os isolados quanto a patogenicidade. Muller et al. (2005) utilizaram a técnica de RAPD para investigar a diversidade genética de 20 isolados de *B. sorokiniana*, dos quais 19 mostraram-se fortemente relacionados, com um coeficiente de similaridade de 78%.

Jaiswal et al. (2007) caracterizaram 155 isolados de *B. sorokiniana* quanto a características morfológicas e patogênicas. Os autores agruparam os isolados relacionando a coloração micelial à patogenicidade e encontrando alta diversidade entre os isolados. Pandey et al. (2007) obtiveram 86 isolados clonais a partir de um único isolado de *B. sorokiniana*, separando-os em três grupos conforme características morfológicas. A amplificação do DNA genômico utilizando RAPD revelou um fragmento presente em todos os isolados, que poderia ser utilizado como marcador molecular para esta espécie. Nascimento & Van Der

Sand (2007), estudando isolados de *B. sorokiniana* utilizando a técnica de PCR-RFLP das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal, observaram polimorfismos intra-específicos e interespecíficos. No entanto, não foi possível agrupar os isolados de acordo com a região geográfica e tipo de hospedeiro.

2.7 Anastomose de hifas e incompatibilidade vegetativa

A anastomose é caracterizada pela fusão entre hifas, permitindo que ocorra a comunicação entre os compartimentos das mesmas. Quando esta fusão se dá entre hifas de organismos diferentes, há a formação de um heterocário, ou seja, um único talo contendo dois ou mais núcleos de organismos geneticamente distintos (Glass et al, 2000). Em fungos filamentosos, a formação de heterocário está relacionada aos processos de recombinações parassexuais e sexuais. A capacidade de formar heterocários intraespecíficos é uma característica bastante comum em fungos filamentosos (Glass et al., 2000). Entretanto, um fungo individualizado pode ser impedido de formar um heterocário estável com outro fungo de constituição genética similar, por um mecanismo genético denominado incompatibilidade vegetativa ou somática, que impõe uma barreira nos cruzamentos entre organismos geneticamente semelhantes. Este mecanismo contribui para a conservação genética dentro de uma população, além de restringir a disseminação de partículas infecciosas, como microvírus ou organelas debilitadas (Marek, 2003).

A anastomose de hifas é dividida em três etapas: pré-contato, pós-contato e fusão. A etapa de pré-contato está relacionada com a difusão de

substâncias químicas no meio de cultura. Durante a fusão de hifas, há a desestruturação das paredes celulares por ação de enzimas hidrolíticas na região de encontro das hifas. Já no pós-contato, ocorrem a mistura de citoplasmas e fusão de núcleos (Glass et al, 2000).

A variabilidade genética em fungos pode ser causada por mutações e sistemas de recombinação, como o ciclo sexual e parassexual, que combinam características de diferentes organismos em um mesmo indivíduo. O início destes processos se dá com anastomoses de hifas de diferentes linhagens para a formação de um heterocário estável, onde ocorrerá a fusão de núcleos e posterior meiose. Assim, este processo é importante para o aumento e compreensão da variabilidade genética apresentada por determinado organismo (Esposito & Azevedo, 2004).

Muitos trabalhos têm reportado a existência de incompatibilidade vegetativa em diferentes espécies fúngicas, como *Verticillium dahlia* (Bellahcene et al., 2005), *Amylostereum areolatum* (Slippers et al., 2001), *Fusarium graminearum* (McCallum et al., 2001), *Neurospora crassa* (Marek et al., 2003), *Phytophthora infestans* (Cherepennikova-Anikina et al., 2002), *Rhizoctonia solani* (Mahmoud et al., 2007), *Colletotrichum gossipii* (Roca et al., 2004), *Sclerotinia homeocarpa* (Powell, 2001), *Glomus mosseae* (Giovanetti et al., 2003), *Sclerotium rolfsii* (Sarma et al., 2002).

2.8 Enzimas extracelulares

A análise da presença de enzimas com a capacidade de degradar a parede celular de plantas, animais e outros microrganismos, é um método extensivamente usado na caracterização da variabilidade em fungos fitopatogênicos. Neste processo, o patógeno é considerado um invasor passivo, incapaz de desenvolver força para romper as barreiras estruturais do hospedeiro. Desta forma, sendo o patógeno dependente de enzimas ou outros metabólitos para sua patogenicidade, uma adequada produção destes é requerida. A interação fungo-planta é determinada por mecanismos de ataque do patógeno e de defesa da planta, sendo estes também influenciados por fatores ambientais (Bocchese, 2003). As enzimas produzidas pelos fungos têm papel importante no processo de infecção do hospedeiro e na quebra de compostos orgânicos.

As enzimas têm sido utilizadas em diversos processos industriais e bioquímicos e, atualmente, no estudo da relação entre patógeno e hospedeiro. Muitas enzimas produzidas por fungos são importantes na digestão e transporte de nutrientes para a célula, assim como no processo de patogênese, principalmente em relação aos fungos necrotróficos, que matam as células do tecido colonizado. Segundo Griffin (1994), enzimas que hidrolisam lipídios, proteínas e ácidos nucléicos são conhecidas, mas o efeito na patogenicidade ainda não está bem esclarecido. Embora pouco estudadas quanto à participação nos processos de penetração e colonização nos tecidos dos hospedeiros, várias enzimas já foram detectadas em fungos através do cultivo em meios específicos.

Estas enzimas são potencialmente importantes na patogênese porque destroem o plasmalema, componente da parede celular (Griffin, 1994).

Dentre as principais exoenzimas estudadas, destacam-se as amilases, celulases, lipases, pectinases, proteases e esterases. Lipídeos são compostos formados por ácidos graxos, sendo encontrados em diferentes formas nas células vegetais: óleos e gorduras, principalmente nas sementes, ceras e cutículas; e fosfolipídeos e glicolipídeos, nas membranas. Muitos microrganismos podem degradar estes compostos utilizando enzimas lipolíticas e gerando ácidos graxos, que podem ser utilizados diretamente pelos microrganismos (Pascholatti, 1995). As lipases fúngicas têm sido extensivamente estudadas, pelo potencial de aplicação em detergentes, óleos e indústrias alimentícias, já que estes organismos as excretam extracelularmente, facilitando a extração em meios de fermentação. Diversos fungos já foram estudados quanto à produção destas enzimas, como *Fusarium solani* (Maia et al, 1999), *Verticillium lecanii* (Lopes-Llorca & Carbonell, 1999), *Trichoderma* sp. (Barbosa et al. , 2001).

O amido é um polímero de glicose que constitui o principal polissacarídeo de reserva em células vegetais. Este polímero pode ser degradado pela ação de enzimas amilases, que o convertem em moléculas de glicose que são diretamente utilizáveis nas atividades metabólicas dos microrganismos (Pascholatti, 1995).

A celulose é um polímero linear não ramificado contendo moléculas de glicose, unidas por ligações glicosídicas tipo β -1,4, as quais são hidrolisadas por

enzimas celulolíticas. O fungo *Fusarium oxysporum*, causador de murcha em plantas, foi estudado e expressou celulases em cultura e *in vitro*, mostrando a importância destas enzimas na patogenicidade (Pascholatti, 1995). As enzimas celulolíticas desempenham importante papel na patogenicidade, degradando a celulose, principal constituinte da parede celular dos vegetais. As celulases formam um complexo enzimático constituído por três enzimas: β -1,4 glucanase, exo β -1,4 glucanases e β -1,4 glucosidase (Pascholatti, 1995). Cada uma destas enzimas atua de forma específica nos polímeros de celulose. A produção de celulases por fungos já foi citada em *Sclerotinia* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Penicillium* sp., *Pythium ultimum* Trow, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* (Atk.) Snyder & Hansen, entre outros fitopatógenos, exercendo papel significativo na interação patógeno-hospedeiro (Piero & Pascholatti, 2000).

Substâncias pécticas são polissacarídeos ácidos de alta massa molar que formam parte das paredes celulares e da lamela média dos vegetais. Devido à importância estrutural e à vulnerabilidade desses polímeros, as enzimas pécticas podem causar maceração dos tecidos (separação das células), lise celular e modificações da parede, permitindo a ação de outras enzimas despolimerizantes que atuam sobre outros substratos, como celulose e lignina. Dentre as principais enzimas pectinolíticas estão as esterases, que desesterificam os grupos metoxila da pectina liberando ácido péctico; e as pectinases, que atacam a pectina fortemente unida ao resto dos componentes da parede celular, liberando pectina solúvel de alta massa molar (Esposito & Azevedo, 2004). Estas enzimas possuem relevante importância na patogenicidade. O fungo geralmente apresenta uma ou

mais enzimas pectinolíticas pré-formadas, em baixos níveis. Quando este entra em contato com os polímeros de ácido galacturônico na parede primária ou lamela média do hospedeiro, libera monômeros ou oligômeros a partir destes polímeros, que podem servir como sinais para síntese de pectinases (Pascholatti, 1995).

Proteases são enzimas responsáveis pela clivagem hidrolítica da ligação amida entre os grupos carboxila e amina dos aminoácidos formadores de ligação peptídica, constituindo um dos mais importantes grupos de enzimas exploradas industrialmente, respondendo por cerca de 25% da produção de enzimas disponíveis comercialmente (Esposito & Azevedo, 2004).

Uma das formas simples e práticas de se determinar a variabilidade de espécies fúngicas consiste na seleção dos fungos através da produção de enzimas hidrolíticas em substratos definidos. A produção de enzimas por fungos em meio sólido é um meio rápido e simples para análise de variações genéticas em uma população, detectando a presença ou ausência de enzimas específicas e auxiliando em estudos ecológicos, taxonômicos e de patogenicidade (Hankin & Anagnostakis, 1975)

2.9 Padrões eletroforéticos de proteínas totais

A eletroforese consiste em uma técnica relativamente simples, rápida e com grande valor informativo, sendo amplamente utilizada para estudos taxonômicos, fisiológicos e genéticos de microrganismos (Alfenas et al., 1991). A possibilidade de se usar a técnica de eletroforese a fim de separar enzimas e proteínas totais extraídas de microrganismos, objetivando a identificação de

fungos em nível de espécies ou mesmo subespécies, tem sido utilizada por um grande número de pesquisadores. A eletroforese de proteínas e isoenzimas tem ajudado na identificação de espécies fúngicas intimamente relacionadas, na relação patógeno–hospedeiro, assim como na variabilidade genética das espécies (Alfenas et al., 1991).

Os perfis de proteínas totais e isoenzimas são marcadores genéticos de grande utilidade na identificação de fungos, sendo considerados de grande importância para a identificação e taxonomia (Alfenas et al., 1991; Rosendahl & Banker, 1998). Em trabalhos com eletroforese podem ser avaliadas as variações no número, na intensidade e na mobilidade relativa das bandas apresentadas no gel, permitindo visualizar grupos de similaridade entre os isolados de uma mesma espécie. As análises de proteínas e isoenzimas em gel de poliacrilamida permitem a diferenciação de espécies que apresentam difícil identificação, devido a grande variabilidade ou a ausência de características morfológicas de importância para um diagnóstico preciso (Hennerbert & Vancnneyt, 1998).

Diversos trabalhos relatam o uso de gel de eletroforese de proteínas totais SDS-PAGE para auxiliar em estudos de classificação de fungos. Park et al. (2000) compararam padrões eletroforéticos de proteínas totais e isoenzimas de diferentes isolados do fungo *Pythium sp.*, oriundos da Coréia e do Japão. Rad et al. (2001) investigaram os padrões proteicos de dez isolados de *Trichophyton rubrum* utilizando gel de poliacrilamida SDS-PAGE. Gel de poliacrilamida e análise numérica também foram utilizados por Hofling et al. (2001) para estudar proteínas solúveis em doze cepas de leveduras orais, pertencentes a cinco espécies.

Jernejc & Cimerman (2001) estudaram as características morfológicas, enzimáticas e padrões de proteínas intracelulares e extracelulares de cinco espécies de *Aspergillus*.

Silveira & Alfenas (2001) caracterizaram isolados de *Rhizoctonia solani* patogênicos a Eucalyptus, por meio de eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida e de isoenzimas em gel de amido. Giovanetti et al. (2003) estudaram a diversidade genética de isolados do fungo micorrízico *Glomus mosseae* de diferentes regiões geográficas, através de compatibilidade vegetativa, características morfológicas, RFLP-ITS, isoenzimas e padrões de proteínas totais. Arabi & Jawhar (2004) avaliaram a variação genética de vinte e sete isolados de *Pyrenophora graminea* através de gel de proteínas SDS-PAGE. Ferreira (2005) analisou a diversidade genética de isolados de *Crinipellis perniciosa*, oriundos de diferentes regiões geográficas, por técnicas de compatibilidade somática, velocidade de crescimento micelial, ensaio imunoenzimático ELISA, Western Blot e eletroforese de proteínas totais. Mahmoud et al (2006) estudou a variabilidade de isolados de *Rhizoctonia solani* utilizando gel de proteínas totais SDS-PAGE, associado a outros métodos, como patogenicidade, incompatibilidade e isoenzimas. De Brito (2006) também utilizou este gel, além de testes de atividade enzimática e características morfológicas, para diferenciar isolados de *Curvularia eragrostidis*.

Assim, diversas técnicas vêm sendo utilizadas no estudo da variabilidade em fungos fitopatogênicos. No entanto, ainda são poucas as informações sobre a variabilidade do fungo *B. sorokiniana*, o que dificulta

estratégias de controle contra o mesmo. Desta forma, torna-se evidente a necessidade de que estudos que abordem a variabilidade deste fungo sejam conduzidos, uma vez que os mesmos poderão gerar informações importantes para o conhecimento desta espécie.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no laboratório de Micologia Ambiental do Departamento de Microbiologia, localizado no Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

3.1 Origem e obtenção dos isolados

O presente estudo utilizou 35 isolados de *Bipolaris sorokiniana* e um isolado de *Bipolaris oryzae*, obtidos a partir de sementes contaminadas provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil e de outros países (Tabela 1) e pertencentes à coleção do laboratório de Micologia Ambiental. Dos 30 isolados de *B. sorokiniana* do Brasil, 27 foram obtidos através de sementes de trigo contaminadas fornecidas pelo CNTP-Embrapa Passo Fundo e um foi isolado de sementes de cevada fornecidas também pelo CNPT-Embrapa Passo Fundo. Os isolados oriundos de outros países foram fornecidos pelo CIMMYT-México. O

isolado de *Bipolaris oryzae* foi fornecido pelo Instituto Riograndense de Arroz (IRGA).

3.2 Obtenção de culturas monoconidiais

Para a obtenção de culturas monoconidiais de cada isolado, o micélio aéreo das culturas policonidiais foi transferido com auxílio de uma alça de platina para tubos de microcentrífuga contendo 2 mL de solução salina 0,85%. Os tubos foram agitados para a liberação completa dos conídios e a suspensão depositada em uma placa de Petri contendo meio agar-água. As placas foram mantidas em repouso por 2 horas, para que os conídios pudessem se aderir ao meio. Após este período, o excesso de água da placa foi removido cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de maneira que os conídios permaneceram aderidos ao meio de cultura na placa. Utilizando-se um estereomicroscópio com aumento de 40x, os conídios foram transferidos assepticamente, com auxílio de uma microagulha de vidro, para tubos de ensaio contendo meio BDA inclinado. Os tubos foram observados sob estereomicroscópio com a finalidade de confirmar a transferência de apenas um conídio em cada tubo. Após, os tubos foram incubados a 25°C com fotoperíodo de 12 horas, até o desenvolvimento completo das colônias. As amostras, após o desenvolvimento da colônia, foram armazenadas sob refrigeração a 4°C.

Tabela 1. Isolados utilizados no estudo, origem geográfica e agrupamento segundo as regiões ITS 1 e ITS2 do DNA ribossomal (Nascimento & Vand Der Sand, 2007)

Isolado	Origem	Hospedeiro	Grupo
98003	Pelotas – RS	Trigo	1
98004	Cruz Alta – RS	Trigo	1
98006	Pelotas – RS	Trigo	3
98007	Cruz Alta - RS	Trigo	2
98010	Santa Rosa - RS	Trigo	15
98011	Lagoa Vermelha– RS	Trigo	4
98012	Lagoa Verm. - RS	Trigo	15
98013	Vitória – PR	Trigo	13
98014	Lagoa Vermelha - RS	Trigo	1
98017	Samambaia_ PR	Trigo	2
98018	Vitória – PR	Trigo	3
98019	Taquá – PR	Trigo	3
98021	Vitória - PR	Trigo	16
98022	Selbach - RS	Trigo	16
98023	Vitória - PR	Trigo	15
98025	Piratini – RS	Trigo	4
98026	Piratini – RS	Trigo	2
98028	Pelotas – RS	Trigo	14
98029	Piratini – RS	Trigo	9
98030	Cruz Alta - RS	Trigo	15
98032	Engenheiro Beltrão - PR	Trigo	14
98033	Landoi - PR	Trigo	20
98040	Piratini – RS	Trigo	7
98041	Vitória - PR	Trigo	14
98042	Piratini – PR	Trigo	13
98043	Pelotas – RS	Trigo	8
1992	Planaltina – GO	Trigo	7
CV13	Guarapuava – PR	Cevada	9
BO2002	Depressão Central – RS	Arroz	8
BS6M1	Jalisco – México	Trigo	12
BS18M2	Veracruz - México	Trigo	19
BS52M1	NuevoLeon - México	Trigo	19
BS16M1	Chiuaua - México	Trigo	20
CS1004	Hanoi – Vietnan	Trigo	12
CS1110	Bangladesh	Trigo	19
1965	Dinamarca	Trigo	12

EXPERIMENTO 1

3.3 Agrupamentos morfológicos

Os isolados foram observados e agrupados de acordo com a morfologia da colônia. Para tanto, discos de micélio de colônias jovens foram repicados para o centro de placas de Petri contendo o meio BDA, sendo cultivados em estufa tipo BOD a 25°C por 5 dias. A análise morfológica consistiu na observação da coloração e textura do micélio, além da formação ou não de setores no mesmo. Os isolados que apresentaram características semelhantes foram incluídos em um mesmo grupo morfológico.

3.4 Taxa de crescimento micelial

Para a avaliação da taxa de crescimento, foram utilizadas placas de Petri com sete centímetros de diâmetro contendo o meio de cultivo BDA, sendo realizadas cinco repetições para cada isolado. Duas linhas perpendiculares (A e B) foram traçadas no verso de cada placa e discos de micélio do fungo com 0,5cm de diâmetro foram inoculados no centro de cada placa, no ponto onde as linhas se interceptavam. As placas foram mantidas em estufa BOD a 24 °C \pm 2, com fotoperíodo de 12 horas. As medidas da taxa de crescimento foram realizadas a cada 24 horas, por um período de 120 horas, utilizando um paquímetro. Os resultados para cada isolado foram expressos pelas médias das taxas de crescimento das 5 repetições. Os diferentes grupos foram comparados quanto ao crescimento pela análise de variância e pós-teste de Tuckey, quando necessário.

3.5 Produção de enzimas extracelulares

Os isolados de *B. sorokiniana* e o isolado de *B. oryzae* foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir enzimas extracelulares em meio sólido. Para tanto, discos de 5mm de diâmetro do micélio de cada isolado foram transferidos individualmente para placas de Petri contendo meio mínimo acrescido do substrato da enzima a ser avaliada, e mantidas por 5 dias a 25°C em estufa BOD com fotoperíodo de 12 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.5.1 Amilases

A produção de amilases foi observada em meio mínimo acrescentando-se 1% de amido solúvel ao meio de cultura. Após o crescimento do fungo, foi adicionado lugol à placa de Petri. O halo formado ao redor da colônia, em contraste com o meio escurecido, indicou a atividade amilolítica.

3.5.2 Celulases

Para avaliar a produção de celulases, foi acrescentado 1% de carboximetilcelulose (CMC) ao meio mínimo. Após o crescimento fúngico, a produção de celulase extracelular foi detectada adicionando-se na placa solução de vermelho-congo por 15 minutos. Posteriormente o corante foi removido utilizando-se uma solução de NaCl 4N. A produção de celulases foi detectada pela formação de um halo alaranjado em contraste com o meio avermelhado.

3.5.3 Proteases

Para a produção de proteases foi utilizado 4% de gelatina como substrato, adicionado ao meio mínimo. Após o período de incubação, foi adicionada solução saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cujo precipitado torna o ágar mais opaco, revelando as zonas claras ao redor das colônias, onde ocorreu a degradação da gelatina.

3.5.4 Pectinases

Para detectar a atividade pectinolítica foi utilizado meio mínimo modificado para pectinases acrescido de 1% de pectina cítrica. Após o crescimento do fungo, foi adicionado solução de brometo de hexadeciltrimetilamônia a 1%. O halo transparente formado ao redor da colônia, em contraste com o meio esbranquiçado, indicou a atividade pectinolítica.

3.5.5 Esterases

Para a análise de esterases, foi utilizado meio mínimo suplementado com 1% de Tween 20 (monooleato de polioxietileno sorbitan), o qual foi autoclavado separadamente e adicionado ao meio momentos antes de vertê-lo às placas de Petri. Após o crescimento fúngico, as placas foram refrigeradas a 4°C por 48h. A produção de esterases foi detectada pela formação de um halo esbranquiçado, visível devido à formação de cristais de sais de cálcio, em contraste com o meio transparente.

3.5.6 Lipases

Para avaliação da atividade lipásica, o meio foi suplementado com óleo de oliva a 2,5% e solução de Rodamina B a 0,001%. Os isolados lipolíticos apresentaram uma fluorescência laranja ao redor das colônias ou no interior das mesmas, quando observados sob radiação UV de 350 nm

3.5.7 Quantificação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi quantificada pela análise da relação H/C, obtida pela divisão da média do diâmetro do halo (H) nas 3 repetições pela média do diâmetro da colônia (C), exceto para lipases, onde foi somente observado a produção ou não da enzima. Os resultados foram analisados utilizando-se o teste de análise de variâncias fator único (ANOVA *one way*), com um nível de significância (α) de 0,01, seguido do pós-teste de Tukey, com α igual a 0,05, quando necessário.

3.6 Avaliação da virulência dos isolados

A avaliação da virulência dos isolados de *B. sorokiniana* foi realizada utilizando-se sementes de trigo do cultivar BRS Buriti, fornecidas pela Embrapa Trigo e classificadas como moderadamente suscetíveis a *B. sorokiniana*. Para produção de inóculo, discos de micélio de cada isolado foram transferidos para placas de Petri contendo meio BDA e incubados em estufa BOD, a 25°C e fotoperíodo de 12h, até que as colônias atingissem um tamanho próximo ao diâmetro total da placa.

As sementes foram inoculadas pelo método descrito por Tanaka e Menten (1991), modificado para o experimento em questão. Foram utilizadas 200 sementes por isolado fúngico, divididas em 4 parcelas de 50 sementes, conforme recomendado pelas Regras para Análise de Sementes (Brasil, 1992). Cada parcela de sementes foi mantida por 24h em placas de Petri com meio de cultura BDA colonizado pelo isolado fúngico a ser testado, em estufa BOD a 25°C com fotoperíodo de 12 horas. A testemunha constou de 200 sementes mantidas em contato apenas com meio BDA, mantidas nas mesmas condições das demais inoculações. Após 24h, as sementes colonizadas foram retiradas das placas e semeadas em bandejas plásticas. O substrato utilizado foi do tipo Plantmax®, esterilizado em autoclave e irrigado antes da semeadura. Cada bandeja constou de uma repetição de 50 sementes, sendo utilizadas 4 bandejas por fungo. As bandejas semeadas foram mantidas em estufa BOD a 25°C, por 10 dias, até a avaliação. A avaliação da patogenicidade foi realizada contando-se o número de sementes germinadas (emersão da folha bandeira com o dobro do tamanho da semente) e não germinadas, com lesões nas folhas (manchas ou cloroses), no colo e podridão de sementes. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de significância.

3.7 Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida

Para extração de proteínas, os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio BDA, que foram mantidas em estufa BOD a 25 °C por 10 dias. Após, o micélio foi raspado com o auxílio de uma espátula e macerado com Nitrogênio líquido, até a obtenção de um pó fino. Amostras de 10 mg de micélio triturado foram depositadas em tubos do tipo Eppendorf, aos quais foram adicionados 0,2 mL de tampão de extração (SDS1%, 9M Uréia, 25mM Tris-HCl pH 6,8, 1mM EDTA, 0,7M β -mercaptoetanol). Os tubos foram homogeneizados, fervidos em banho de água por 2 minutos, homogeneizados novamente e fervidos por um mais um minuto. Os tubos foram, então, centrifugados a 20000g por 20 minutos e o sobrenadante foi coletado. Foram utilizados 30 μ l de extrato protéico acrescido de 10 μ l de tampão de amostra (Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, glicerol 20%, SDS 2%, β -mercaptoetanol 2% e azul de bromofenol 0,005%). As corridas foram realizadas em gel e poliacrilamida SDS-PAGE a 4% (gel concentrador) e 15% (gel separador). O sistema tampão gel-eletrodo utilizado foi o Tris-Glicina pH 8,9. As corridas eletroforéticas foram efetuadas a 150 V por 3 horas. Após a eletroforese, os géis foram fixados em solução fixadora por 2 horas, corados em solução aquosa de Comassie Blue a 1% por 4 horas, descorados em solução descorante por 2 horas, secos e fotoarquivados.

EXPERIMENTO 2

3.8 Avaliação da incompatibilidade vegetativa entre isolados de *Bipolaris sorokiniana*

Para a avaliação da incompatibilidade vegetativa, pareamentos entre as colônias de diferentes isolados foram realizados, conforme os agrupamentos obtidos por Nascimento et al., (2007) para as regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal destes isolados, buscando-se desta forma trabalhar com a menor variabilidade possível. Para tanto, discos de micélio com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro foram retirados de colônias jovens e repicados para placas de Petri contendo meio BDA, sendo combinados dois a dois, a uma distância de 5cm um do outro. Os experimentos foram realizados utilizando-se 3 placas para cada combinação. Para acompanhamento da anastomose das hifas, as placas foram mantidas em estufa do tipo BOD, com temperatura de 25°C, por 40 dias. As análises de ocorrência de incompatibilidade vegetativa foram realizadas aos 20 e 40 dias, por avaliações visuais das regiões de encontro. As avaliações foram realizadas de acordo com o comportamento na área de encontro das hifas em cada combinação. Estas foram classificadas em três grupos, conforme a classificação estabelecida por Roca et al. (2004). No primeiro grupo, foram considerados os isolados que tiveram seu crescimento inibido pela presença das hifas de outro isolado, não ocorrendo portanto o encontro de hifas, sendo considerados incompatíveis vegetativamente. O segundo grupo caracterizou-se por isolados que cresceram normalmente, sem nenhuma inibição pela presença

de hifas de outro isolado, sendo denominados compatíveis vegetativamente. Já no terceiro grupo, foram incluídos os isolados que apresentaram comportamento intermediário, ou seja, apresentaram um crescimento que foi afetado pela presença de outro isolado, porém não completamente inibido.

3.9 Influência de diferentes meios de cultivo na manifestação da incompatibilidade

Para verificação da influência do meio de cultivo sobre a incompatibilidade vegetativa dos isolados, foram escolhidos 5 isolados, pertencentes a diferentes grupos das regiões ITS, buscando-se selecionar os isolados mais distantes geneticamente. Neste teste, foram utilizados cinco diferentes meios de cultivo: BDA, Saboraud dextrose, ágar Czapek, ágar extrato de malte e ágar-água. Os isolados foram pareados da mesma forma como citado acima, utilizando-se todos os pareamentos possíveis para estes cinco isolados. As análises de incompatibilidade foram realizadas da mesma maneira descrita anteriormente.

3.10 Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida

Buscando estudar a incompatibilidade vegetativa à nível molecular, foram escolhidos 4 agrupamentos testados no teste de incompatibilidade vegetativa, sendo três caracterizados como incompatíveis e um compatível. Destes, foram extraídas proteínas dos isolados crescendo isoladamente e crescendo na presença do outro isolado. As extrações e corridas se deram da

mesma maneira citada anteriormente. Após as corridas, o gel foi fixado com solução fixadora por 1 hora e lavado com etanol 50% por 1 hora. Ao gel foi acrescentado 0,02% de tiosulfato de sódio por 1 minuto, sendo após lavado com água corrente por 1 minuto. Após, foram adicionados 100 mL de solução de coloração fresca, sendo o gel mantido no escuro por 20 minutos. Novamente, o gel foi lavado em água corrente por 1 minuto e a este foi acrescentada solução de revelação até o surgimento das bandas. A reação foi interrompida com ácido acético 1%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

EXPERIMENTO 1

4.1 Grupos morfológicos e taxa de crescimento

Os 36 isolados estudados neste trabalho foram caracterizados em relação às suas características morfológicas e crescimento micelial. A análise da morfologia colonial foi realizada considerando-se as cores e texturas exibidas pelo micélio, presença ou ausência de setores e tipo de crescimento, quando cultivado em meio BDA. Os isolados analisados apresentaram grande variabilidade, formando cinco grupos morfológicamente distintos (figura 1), sendo classificados como: a) negros de crescimento afeltrado com setores brancos (grupo I), b) negros de crescimento aveludado com ausência de setores (grupo II), c) cinzentos de crescimento algodinoso com ausência de setores (grupo III), d) brancos de crescimento algodinoso com ausência de setores (grupo VI) e e) brancos de crescimento suprimido com ausência de setores (grupo V).

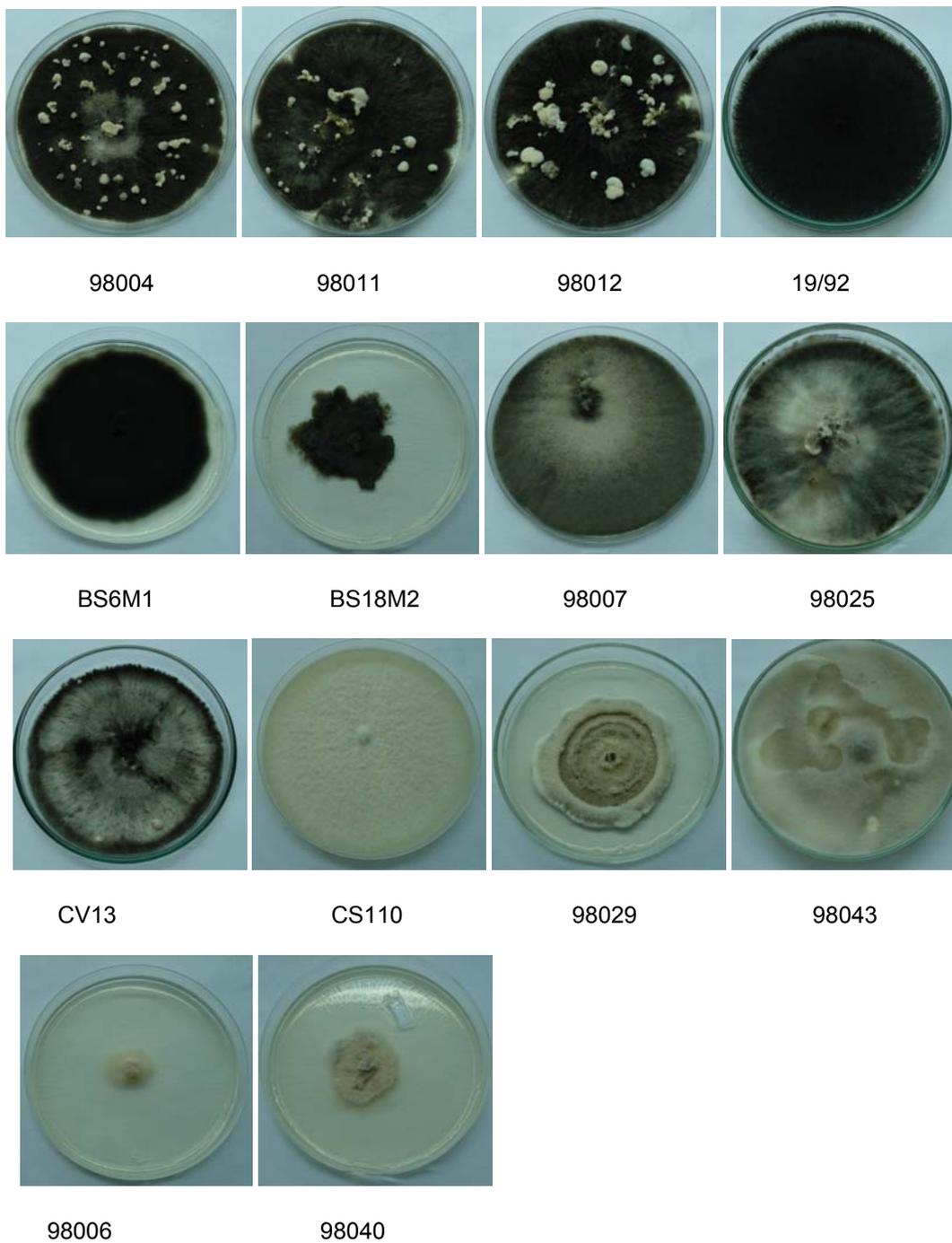


Figura 1- Isolados representando os cinco agrupamentos morfológicos de *B. sorokiniana*. Grupo I – Isolados 98004, 98011 e 98012. Grupo II – Isolados 19/92, BS6M1, BS18M2. Grupo III – Isolados 98007, 98025 e CV13. Grupo IV – Isolados CS110, 98029 e 98043. Grupo V – Isolados 98006 e 98040

Os grupos I e III foram predominantes, com 38,88% e 36,11% dos isolados, respectivamente. Os menos freqüentes foram os grupos VI, II e V, com 11,11%, 8,33% e 5,55% dos isolados, respectivamente (tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos grupos morfológicos formados pelos trinta e seis isolados de *B. sorokiniana*

Grupo	Características	Número de Isolados	Porcentagem	Código dos Isolados
I	Negros de crescimento afeltrado com setores brancos	14	38,88%	98004, 98011, 98012, 98013, 98014, 98018, 98021, 98022, 98023, 98026, 98030, 98033, 98041, 1965
II	Negros de crescimento aveludado com ausência de setores	4	8,33%	19/92, BS6M1*, BS18M2*
III	Cinzentos de crescimento algodonoso com ausência de setores	13	36,11%	98003, 98007, 98010, 98017, 98025, 98028, 98032, 98042, BO2002, CV13*, CS1004*, BS52M1*, BS16M1*
VI	Branco de crescimento algodonoso com ausência de setores	4	11,11%	98019, 98029, 98043, CS1110*
V	Branco de crescimento suprimido com ausência de setores	2	5,55%	98006, 98040

* Isolados oriundos de outros países (Cedidos pelo CYMMIT)

A taxa de crescimento micelial foi avaliada em intervalos de vinte e quatro horas, por um período de 5 dias, pela medição do diâmetro da colônia em dois sentidos diametralmente opostos e realizado o cálculo da média por placa. Sempre se mantiveram constantes durante o cultivo dos isolados as condições de fotoperíodo, temperatura e pH. Nas figuras 2 a 6 encontram-se as curvas de crescimento dos isolados, conforme o grupo morfológico a que pertencem, considerando-se as médias das medidas das cinco repetições para cada isolado. Diferenças nas velocidades de crescimento dos isolados puderam ser observadas nas primeiras 24 horas após a inoculação.

As curvas de crescimento dos isolados do Grupo I mostraram-se semelhantes quanto ao seu crescimento micelial, entrando em fase estacionária, em sua maioria, no quinto dia de cultivo. Destes, o isolado 98033 foi o que apresentou o maior crescimento, enquanto o menor crescimento foi o do isolado 98018 (figura 2). No grupo II, o isolado 19/92 apresentou uma taxa de crescimento bastante superior aos demais isolados, ainda estando em fase logarítmica no quinto dia de cultivo (figura 3). O Grupo III foi caracterizado por isolados de crescimento bastante heterogêneo, apresentando grandes variações a partir do terceiro dia de cultivo. Os isolados com maior crescimento no grupo e também considerando todos os grupos, foram, respectivamente, BO2002, 98017 e 98003, sendo que o menor crescimento foi apresentado pelo isolado 98028 (figura 4). No Grupo IV, o isolado 98043 apresentou o maior crescimento, enquanto o menor crescimento foi verificado para o isolado 98019 (figura 5). Os isolados do Grupo V caracterizaram-se por escassa formação e crescimento micelial, apresentando

curvas de crescimento semelhantes (figura 6). O fato de estes isolados apresentarem crescimento extremamente lento pode sugerir que provavelmente estes apresentam outras habilidades que não são expressas *in vitro*, as quais permitem a estes microrganismos competirem com outros fungos em igualdade dentro do hospedeiro. Carrol (1995) ressalta que fungos de crescimento rápido sempre serão predominantes. No entanto, pouco se sabe sobre o comportamento competitivo das espécies dentro do hospedeiro e também na presença de outros microrganismos.

Os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) e Tukey foram realizados, a fim de verificar a existência de diferenças significativas entre os grupos morfológicos. Diferenças significativas foram observadas entre os grupos III e V, enquanto os demais grupos não diferiam entre si.

A variabilidade entre os isolados, verificada pela formação de grupos morfológicos e diferentes taxas de crescimento, pode ser explicada pela diversidade geográfica de origem e hospedeiros dos mesmos, características fisiológicas, condições de cultivo, tempo de manutenção no laboratório e sucessão de repiques. Rosa & Menezes (2001) relataram tal variabilidade, observando diferenças no processo de crescimento, em função das condições de cultivo e das características dos próprios isolados. Quando os isolados são analisados em diferentes meios de cultivo ou até mesmo em um mesmo substrato, como relatado neste estudo, observa-se uma grande variabilidade de comportamento em relação ao crescimento micelial. Artigiani Filho & Bedendo (1996) relatam que o comportamento dos isolados pode estar relacionado aos componentes de cada

meio de cultivo, mostrando variação no crescimento e na coloração da colônia, entre outras características específicas.

Ao considerar a origem geográfica dos isolados, observa-se que o crescimento micelial foi também variável, mesmo entre aqueles provenientes de uma mesma região. Uma possível explicação para tais observações pode estar no fato de que alguns isolados, embora provenientes de um mesmo estado, foram obtidos a partir de plantas produzidas em localidades com características edafoclimáticas distintas nas regiões geográficas amostradas ou em lavouras com manejos diferentes. Assim, pode-se afirmar que a taxa de crescimento micelial não foi suficiente para estabelecer qualquer correlação entre essa variável e a origem geográfica dos isolados, sugerindo que outros fatores poderiam estar relacionados com a variabilidade.

Valim-Labres et al. (1997) apontam que a diversidade de microrganismos não é ocasionada unicamente por pressões do ambiente decorrentes de diferenças geográficas, como temperatura, umidade relativa do ar e fotoperíodo. Da mesma forma, Nascimento & Van Der Sand (2007), estudando a variabilidade de isolados de *B. sorokiniana* pelas regiões ITS do DNA ribossomal, não observaram correlação entre grupos de similaridade genética e origem geográfica de isolados de *B. sorokiniana*, inferindo que dificilmente a expressão dos aspectos morfofisiológicos seria condicionada por genes únicos. Assim, esta variabilidade poderia ser atribuída às interações entre informação genética e condições ambientais.

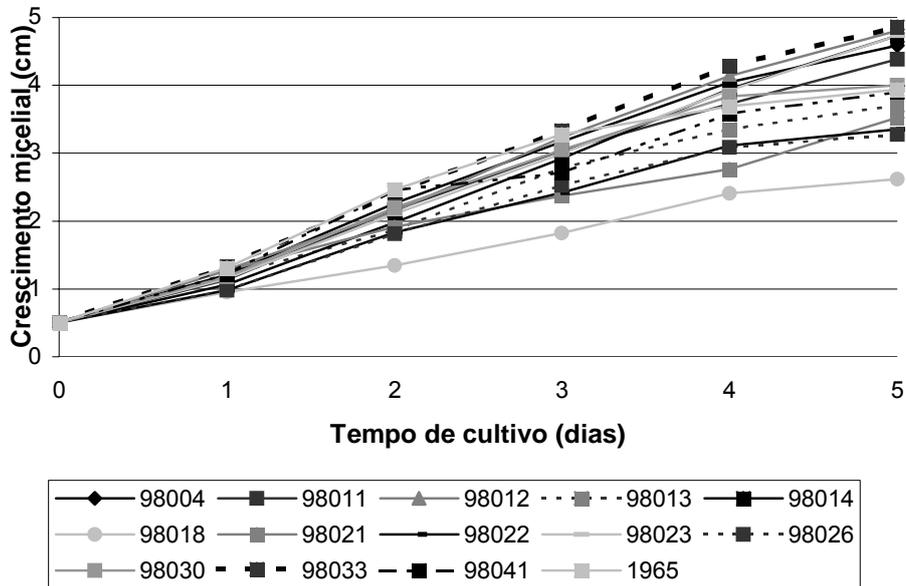


Figura 2 - Curva de crescimento dos isolados do Grupo I quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.

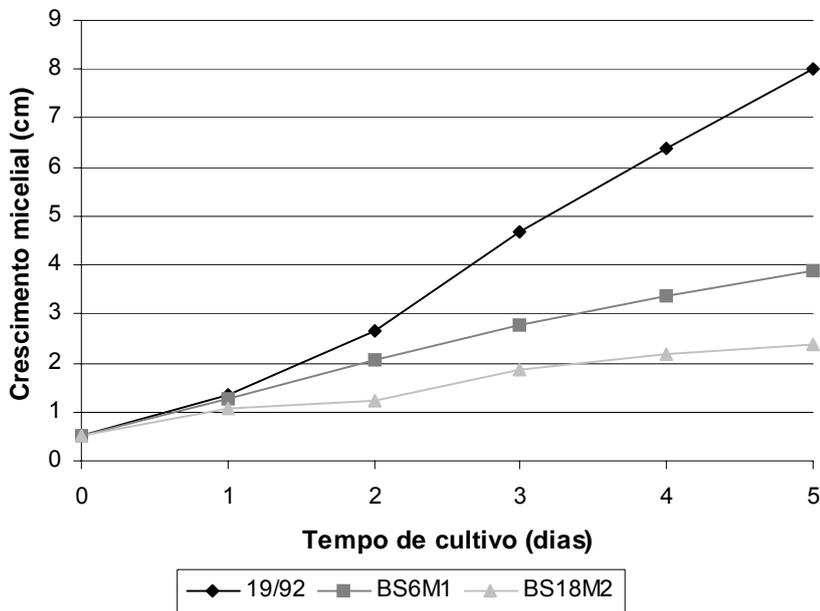


Figura 3 - Curva de crescimento dos isolados do Grupo II quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.

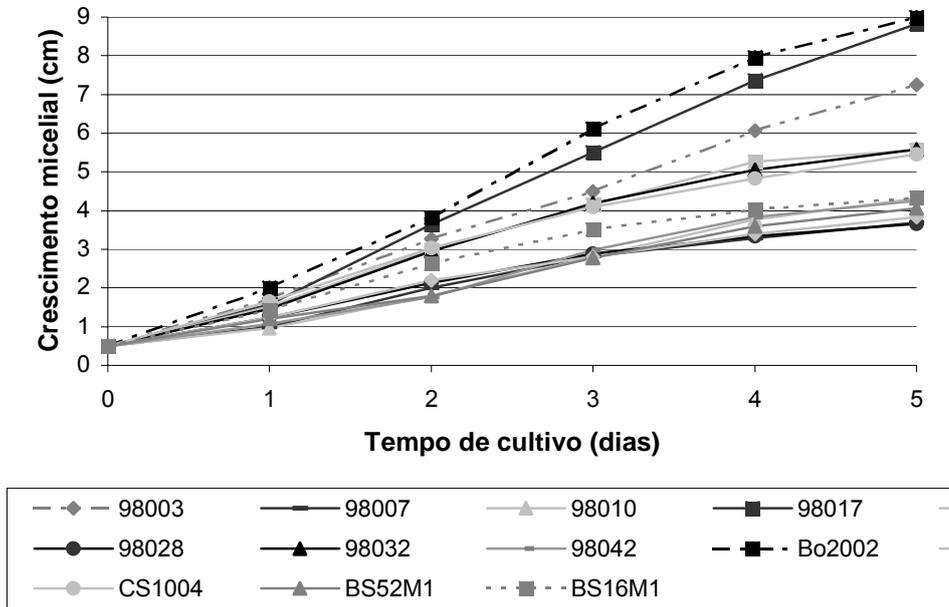


Figura 4 – Curva de crescimento dos isolados do Grupo III quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.

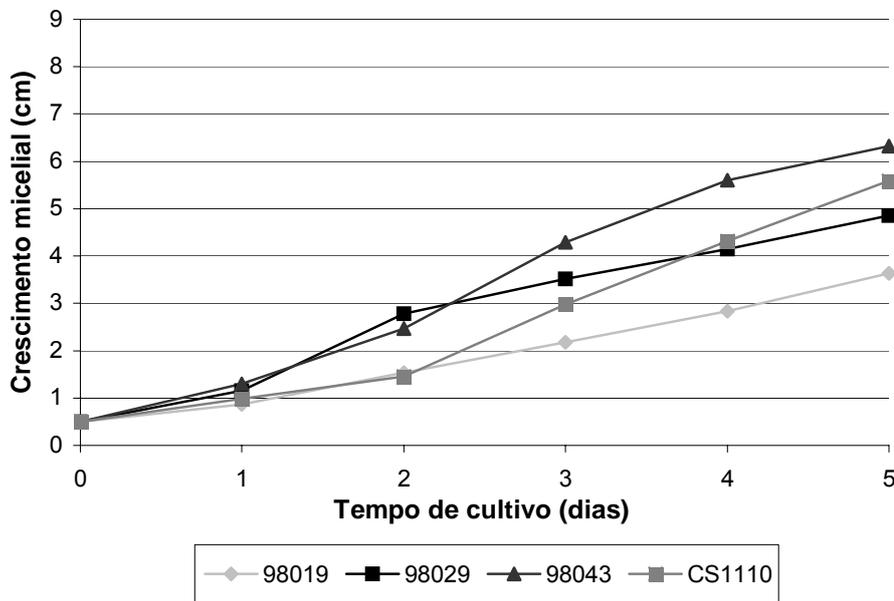


Figura 5 – Curva de crescimento dos isolados do Grupo IV quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.

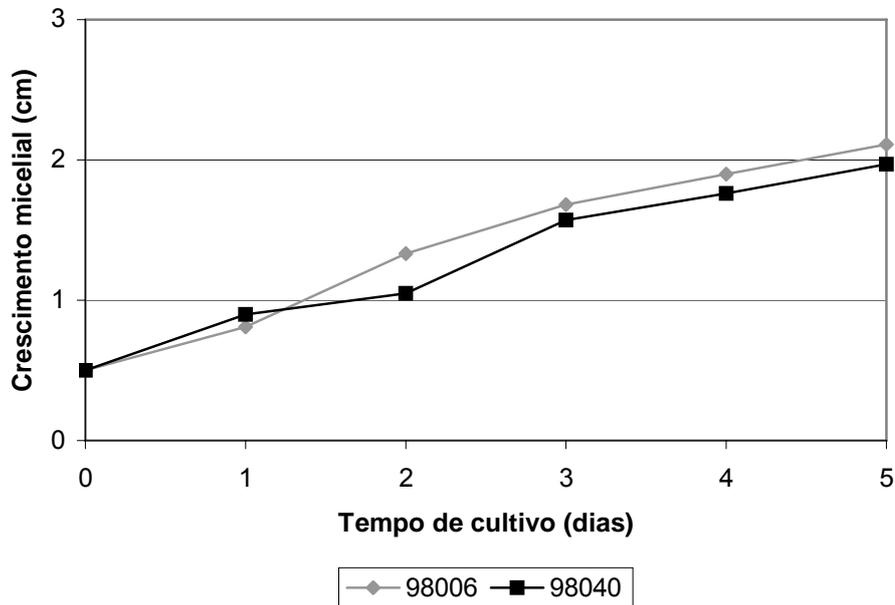


Figura 6 – Curva de crescimento dos isolados do Grupo V quando cultivados em meio de cultura BDA, à temperatura de 25°C, durante 5 dias.

4.2 Atividade enzimática

Os isolados de *B. sorokiniana* foram avaliados quanto à capacidade de produzirem enzimas extracelulares, sendo a produção avaliada através de halos de degradação presentes em meios sólidos específicos (figura 7). A atividade enzimática tem sido bastante utilizada no estudo da variabilidade fisiológica em fungos fitopatogênicos. A maior ou menor capacidade dos fungos em produzirem enzimas em substratos específicos permite diferenciar isolados de uma mesma espécie de forma simples. Além disso, conforme Hancock & Millar (1965), a atividade patogênica de alguns fungos está diretamente relacionada com sua capacidade de produzir enzimas degradadoras de parede celular.

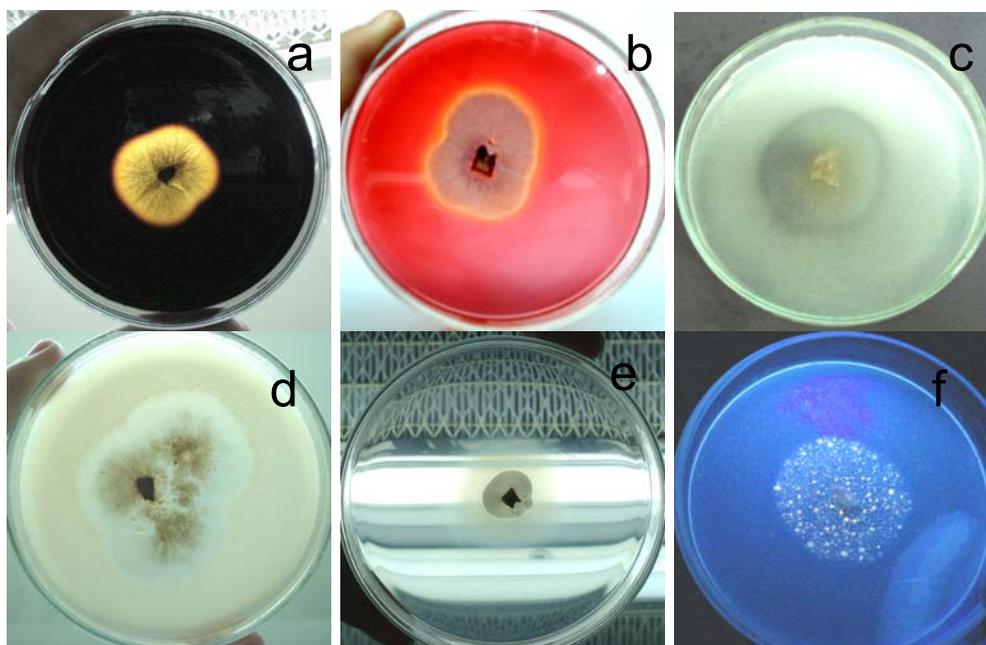


Figura 7 - Halos produzidos pela hidrólise de substratos pelas enzimas. a) amilases; b) celulases; c) proteases; d) pectinases; e)esterases; f) lipases

Em relação à atividade amilolítica, o isolado BS18M2 apresentou o maior índice de atividade enzimática (Fig. 8), expresso pela relação halo/colônia de degradação de amido que neste isolado foi de 1,35, enquanto a menor detecção se deu para o isolado CS1110 ($H/C = 0,42$).

Fungos podem utilizar o amido como fonte de energia para o crescimento e esporulação (Griffin, 1994). Segundo Nwufo & Fajola (1988), a produção de amilases por fungos filamentosos varia de acordo com o gênero e a espécie envolvida.

De acordo com Dianese (1990), as amilases são comuns em fungos, causando a hidrólise de amido, mas pouco se sabe sobre a sua importância na patogênese. Estudos realizados por Almeida et al. (1998), com variedades de cacau, demonstraram que a quantidade de amido existentes nestas plantas poderia estar associada com o seu grau de tolerância ao fungo *Crinipellis pernicioso*, causador da vassoura-de-bruxa. Produtos da hidrólise do amido poderiam aumentar o potencial osmótico das células, impedindo o crescimento das hifas ou serem usadas em rotas bioquímicas para defesa da planta.

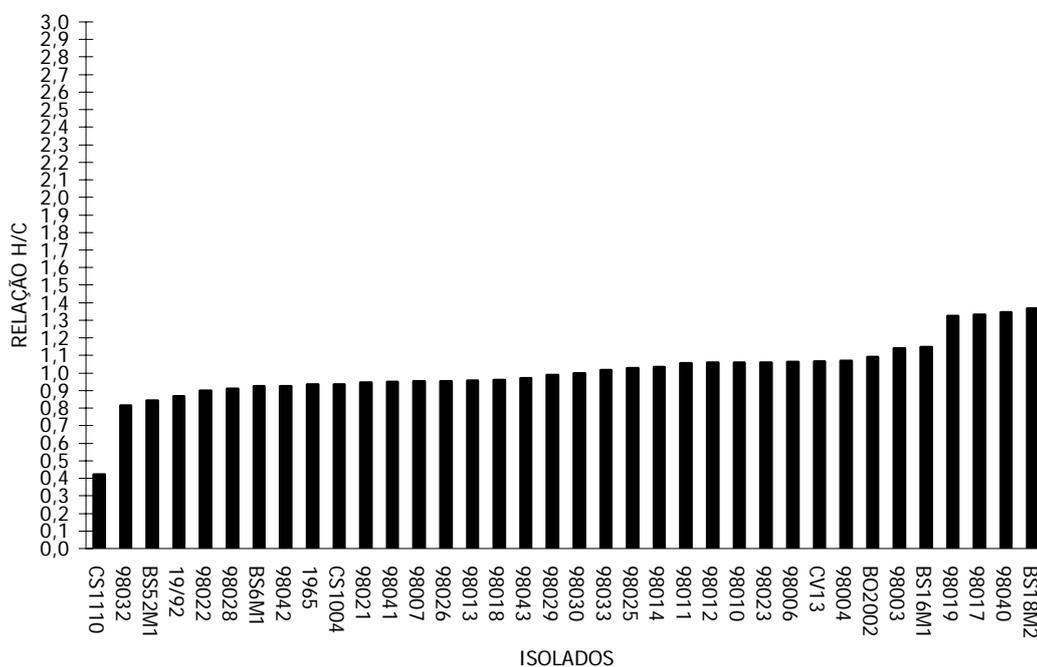


Figura 8 – Relação halo/colônia (H/C) dos isolados de *B. sorokiniana* para atividade de amilases

Na figura 9 encontram-se as relações halo/colônia para a atividade de carboximetilcelulases. O isolado 98029 foi o maior produtor desta enzima (H/C=1,36), sendo a menor capacidade encontrada para o isolado 19/92 (H/C=0,83). Pascholati (1995) estudou a produção de celulases em isolados de *Fusarium oxysporum* e comprovou a produção *in vivo* e *in vitro* destas enzimas. Celulases também já foram citadas em *Sclerotinia* sp., *Rhizoctonia solani* Kühn, *Penicillium* spp. e *Pythium ultimum* Trow (Piero & Pascholati, 2000). Sugere-se que estas enzimas desempenhem importante papel na patogenicidade, já que a celulose é o principal constituinte da parede celular vegetal

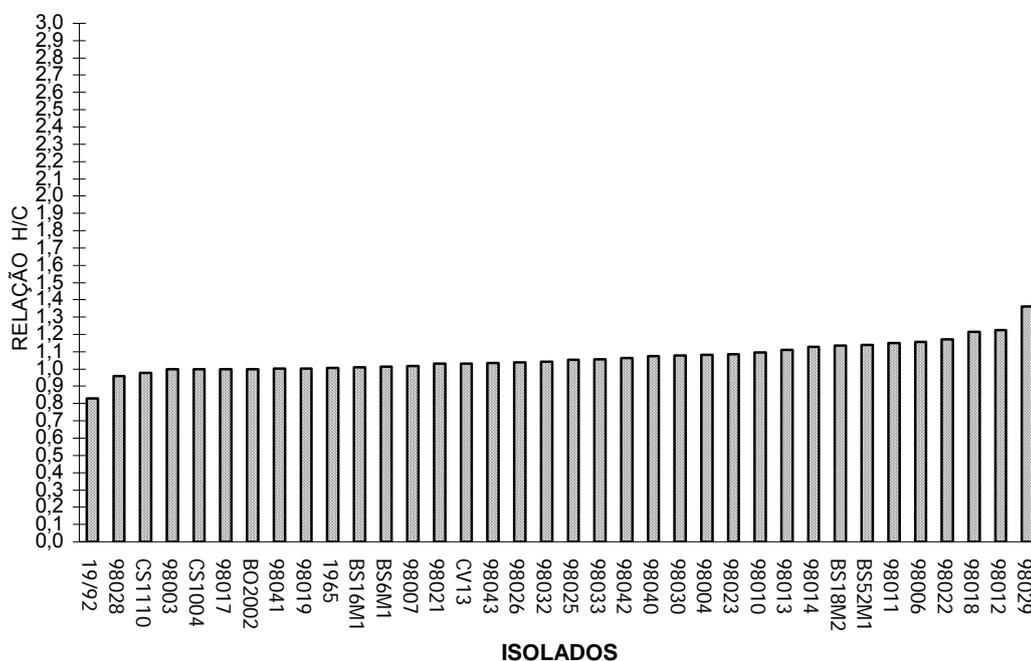


Figura 9 - Relação halo/colônia dos isolados de *B. sorokiniana* para atividade de carboximetilcelulases

A enzima protease tornou-se evidente durante a degradação do meio específico, sobre o qual vinte e sete isolados testados mostraram atividade desta enzima (Fig. 10), destacando-se o isolado CS110 (H/C= 1,04) que apresentou o maior halo de degradação. Os isolados 98003, 98006, 98011, 98014, 98025, 98028, 98032, 98033 e 98042 não foram capazes de produzir esta enzima. Possivelmente, um maior período fosse necessário para que estes isolados expressassem a produção de proteases. Couto (2002) verificou que isolados de *Curvularia musae* obtidos de banana demonstraram maior atividade proteolítica que amilolítica, celulolítica e lipolítica, sugerindo que esta enzima poderia estar correlacionada a patogenicidade neste organismo.

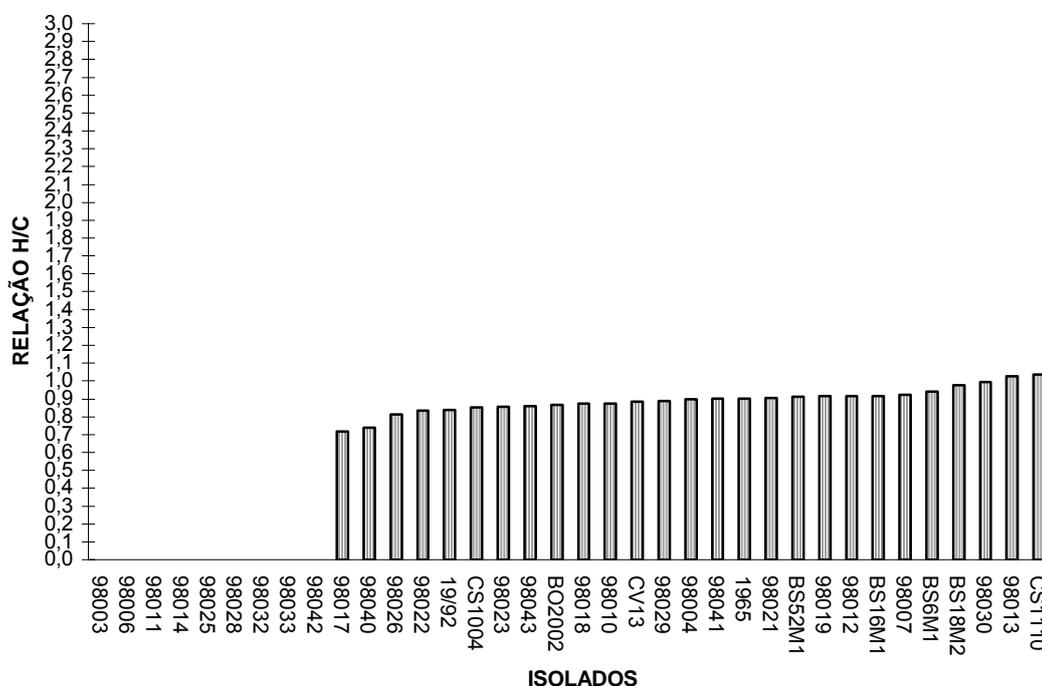


Figura 10 - Relação halo/colônia dos isolados de *B. sorokiniana* para atividade de proteases

Vinte e dois isolados foram capazes de produzir pectinases (Fig.11). Destes, o isolado 98025 foi o maior produtor (H/C= 1,36), seguido do isolado 98040 (H/C=1,21). As enzimas pectinolíticas estão entre as mais estudadas quanto ao papel na patogenicidade. Uma das razões para tal interesse deve-se ao tratamento de tecidos vegetais com pectinases purificadas, o que ocasiona na separação e morte das células. Este processo ocorre durante o desenvolvimento de muitas doenças, principalmente nas podridões moles, onde os tecidos perdem a rigidez. No entanto, Pascholati (1995) ressalta que a produção de pectinases por microrganismos não se constitui em prova definitiva da importância das mesmas no processo de patogenicidade. A indução poderia estar mais ligada à obtenção de nutrientes do que a patogenicidade.

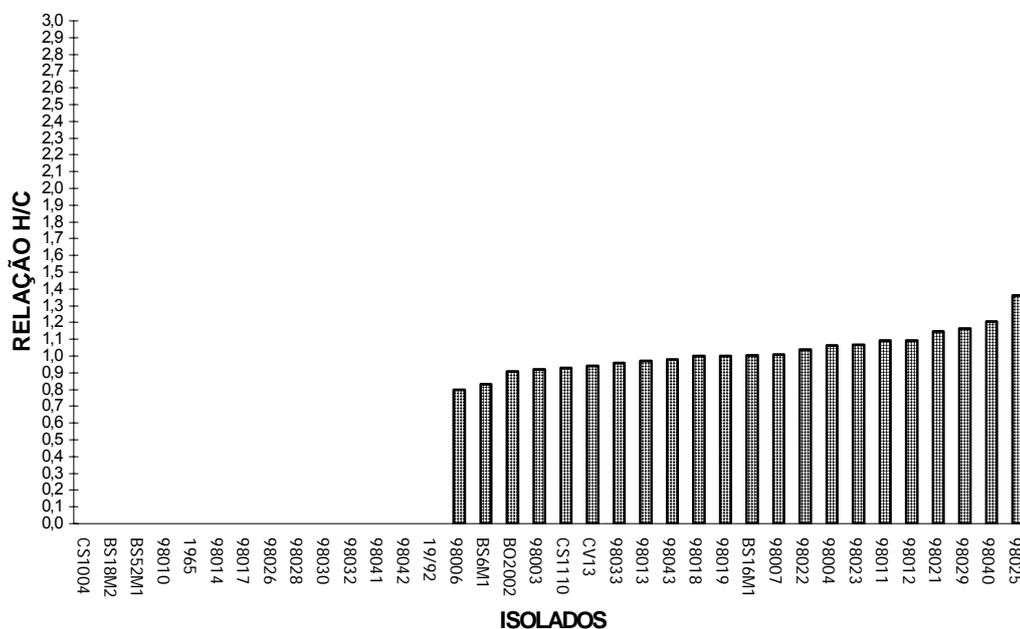


Figura 11 - Relação halo/colônia dos isolados de *B. sorokiniana* para atividade de pectinases

A enzima esterase apresentou os mais altos índices de H/C, que foram de 2,95 para o isolado 98017. Segundo Lealem & Gashe (1994), são recomendados valores de índice de atividade enzimática maior ou igual a 2 para comprovar a habilidade de um microrganismo em degradar substratos em meio sólido. Considerando este valor, apenas no teste de esterase foram encontrados tais índices, para os isolados 98017, CS1110 e 98011. De acordo com Gillespie & Langley (1974) a esterase se encontra em um grupo de enzimas que utilizam substratos múltiplos, freqüentemente de origem externa, e que respondem diretamente à diversidade ambiental.

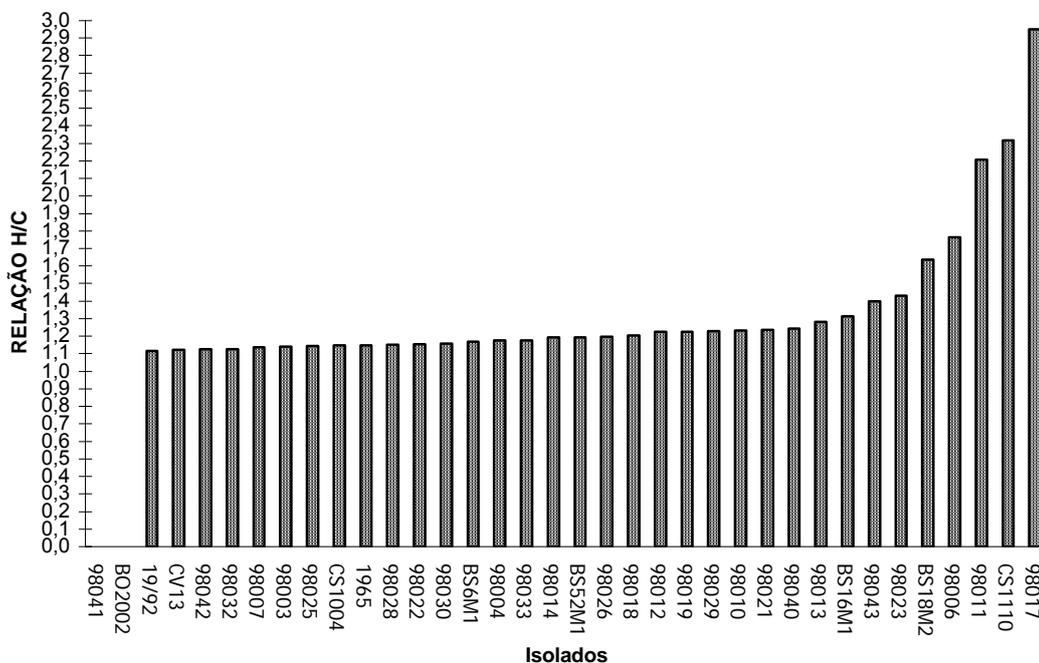


Figura 12 - Relação halo/colônia dos isolados de *B. sorokiniana* para atividade de esterases

McKeen (1974), trabalhando com o fungo *Botrytis cinerea* Pers e Nicholson *et al.* (1972), em estudos com o fungo *Venturia inaequalis* (Cke.) Wint. demonstraram, através de estudos histoquímicos, a presença de atividade esterásica próximo ao sítio de penetração das células hospedeiras. Já Pascholati *et al.* (1992), analisando a ultraestrutura da interação patógeno/hospedeiro, relacionaram a presença de esterase junto aos esporos de *Erysiphe graminis* D.C. f.sp. *hordei* Marchal, durante a penetração destes nas células hospedeiras

A enzima lipase foi detectada pela presença de fluorescência alaranjada sobre as colônias, sendo classificada como positiva ou negativa e, portanto, não quantificada. Esta foi positiva apenas para os isolados BS6M1, CS1110, 98006, 98007, 98019, 98029, 98032 e 98040. Segundo Kolattukudy (1985), existem evidências de que a cutinase, uma lipase capaz de degradar a cutina, esteja diretamente envolvida na penetração do fungo pela cutícula, desempenhando papel importante na patogenicidade.

Considerando os resultados para todas as enzimas testadas, apenas as enzimas amilases e celulases foram produzidas por todos os isolados. O teste para lipases foi o que apresentou a menor porcentagem de isolados com resultado positivo, cerca de 22% (Fig.13). As médias da relação H/C de todos os isolados para cada teste variaram de 0,89 em proteases a 1,34 em esterases (Fig.14), considerando apenas os isolados com resultado positivo e excluindo lipases, que não foram quantificadas. As médias da relação H/C de cada isolado em todos os testes variaram de 0,91 a 1,5 (Figura 15).

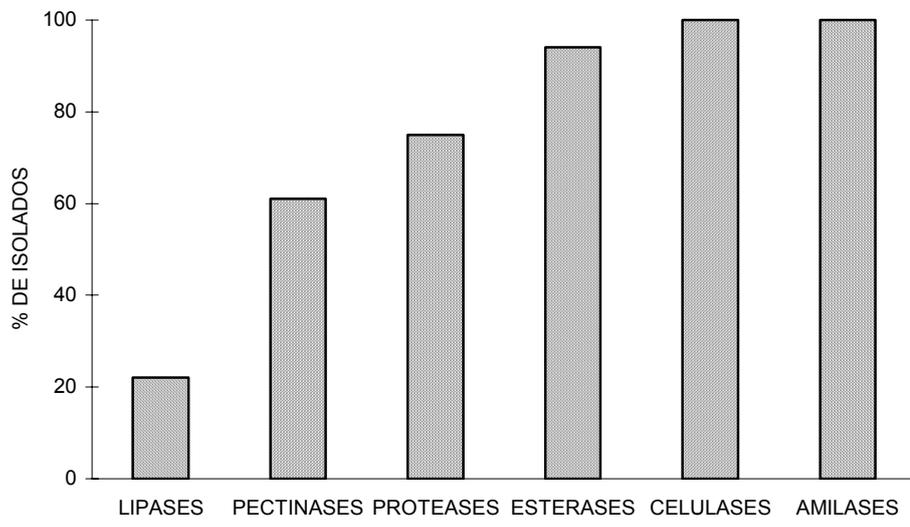


Figura 13 - Porcentagem de isolados com produção em cada teste.

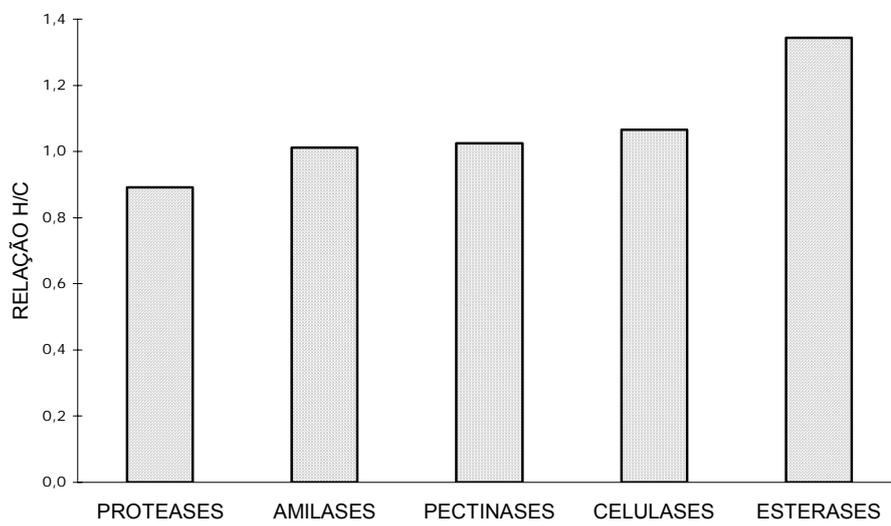


Figura 14 - Médias da relação H/C de todos os isolados para cada teste

As médias da relação H/C de cada isolado em todos os testes variaram de 0,91 a 1,5 (Figura 15). Considerando-se estas médias, o isolado 98017 foi o que apresentou a maior atividade enzimática.

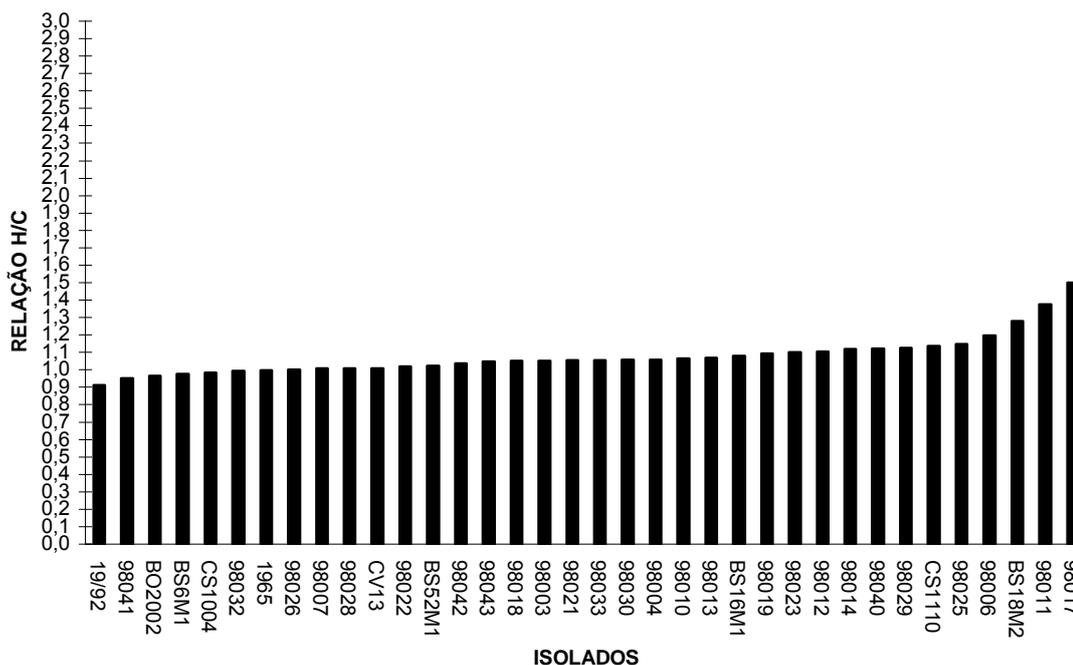


Figura 15 - Médias da relação H/C de cada isolado em todos os testes

Comparando-se os isolados entre si, verificou-se grande variabilidade quanto à produção enzimática. Muitos isolados apresentaram boas atividades para determinadas enzimas, porém baixas atividades em outras. Como exemplo cabe citar o isolado 98017, que obteve, quando comparado aos demais isolados, altos índices de atividade de esterases e amilases, porém não apresentando atividade de pectinases e lipases. Da mesma forma, o isolado CS110 esteve entre os maiores produtores de proteases e esterases, mas não foi capaz de produzir

amilases. Quanto aos diferentes agrupamentos morfológicos, não foi possível correlacionar a atividade enzimática com o grupo morfológico, encontrando-se diferenças entre os isolados independentemente da coloração e taxa de crescimento.

Para testar se a diferença observada nas atividades enzimáticas de cada teste realizado teria significância estatística, foi realizado o teste de análise de variância (ANOVA), pelo qual foram constatadas que as diferenças observadas eram significativas. Para identificar quais médias que, quando tomadas duas a duas, diferiam entre si, foi feito o pós-teste de Tukey. Para um nível de significância de 0,05, foi observado que a média da produção de esterases diferia significativamente de todas as outras, enquanto que as outras não diferiam entre si. Pode-se afirmar, portanto, que os isolados analisados apresentam uma atividade enzimática maior para esterases do que para as outras enzimas testadas. Isto poderia ser explicado pela extrema importância de tais enzimas na fase inicial do processo de aderência e invasão do tecido vegetal por fungos fitopatógenos. Além disso, como muitas delas são ativas sobre uma gama de substratos, supõe-se que elas facilitem o acesso de organismos às fontes de carbono, participando de seu catabolismo (Jaeger & Reetz, 1998).

As médias da relação H/C de cada isolado em todos os testes variaram de 0,91 a 1,5 (Figura 15). Desta vez, o teste ANOVA foi realizado a fim de verificar se as diferenças observadas nas atividades enzimáticas de cada isolado testado teriam significância estatística. O valor calculado de F foi de 0,710, enquanto que

o valor tabelado de F para um nível de significância de 0,01 era de 1,807, aceitando-se, assim, a hipótese nula.

4.3 Virulência dos isolados a sementes e plântulas de trigo

Os isolados foram avaliados quanto à capacidade de produzir sintomas das moléstias causadas por *B. sorokiniana* em trigo. Na tabela 3 encontram-se os resultados da ação dos 35 isolados do fungo sobre sementes e plântulas de trigo. De acordo com o isolado inoculado, foram observadas distintas ações sobre a porcentagem de emergência de plântulas totais, de plântulas sem sintomas e de plântulas com sintomas. Também se encontram as porcentagens de sementes germinadas e não germinadas que apresentaram sintomas, bem como as porcentagens de sintomas na parte aérea e colo. Ressalta-se, entretanto, que as condições deste teste são hipotéticas, onde todas as sementes foram infectadas ou infestadas pelos fungos, o que não ocorre na natureza.

Os sintomas foram classificados como mancha foliar ou clorose na parte aérea, mancha no colo e podridão de semente. Na parte aérea, os sintomas foram caracterizados pela formação de pequenos pontos que evoluíram para lesões ovaladas de coloração marrom-escuro e halo amarelado, com intensa esporulação no local (figura 16-d) ou por clorose em algumas regiões da folha. No colo, as lesões foram bastante semelhantes às encontradas nas folhas, espalhando-se por toda a extensão do mesmo (figura 16-e) e sendo este o sintoma mais freqüente. Já as sementes foram caracterizadas por intensa

esporulação na ponta dos grãos (figura 16-a), que em casos mais graves se estenderam por toda a semente, apodrecendo-a (figura 16-c). Em alguns casos foi observado crescimento micelial na semente (figura 16-b). Os isolados negros (Grupos I e II) tiveram sua infecção caracterizada por intensa esporulação na semente, enquanto os cinzentos e brancos (Grupos III, VI e V), ao contrário, caracterizaram-se por pouca esporulação e intenso crescimento micelial. É importante salientar que a variável mais importante para a patogenicidade é a porcentagem de emergência, pois esta não pode ser modificada. Os sintomas, ao contrário, podem ser recuperados e, portanto, não afetar a formação de plantas vigorosas.

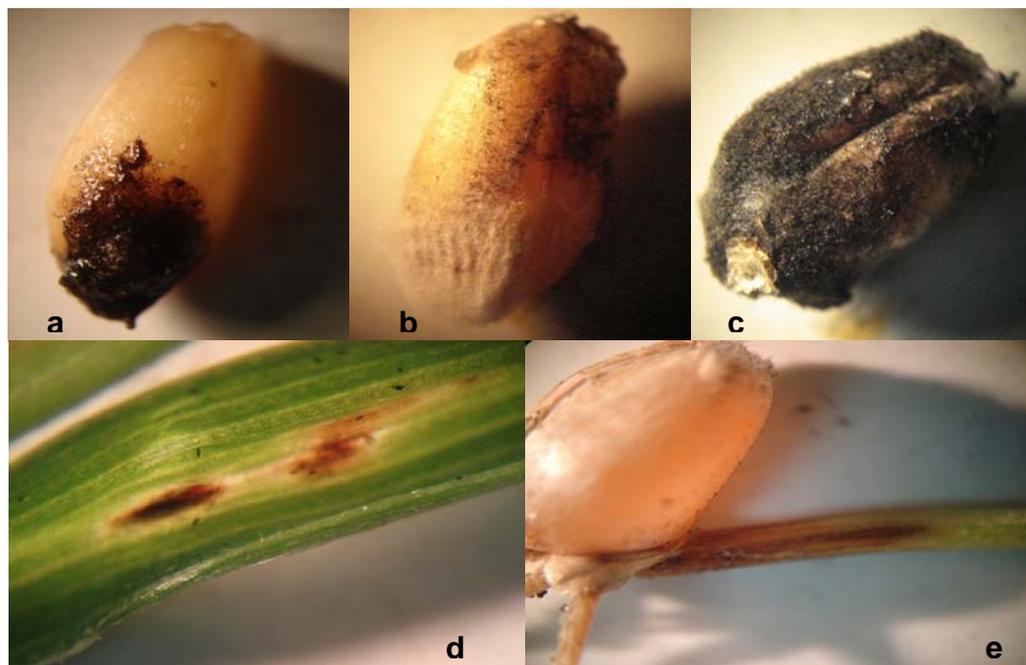


Figura 16 – Sintomas apresentados por sementes e plântulas. a) Semente com ponta preta, b) sementes com esporulação e crescimento micelial, c) semente apodrecida com intensa esporulação, d) mancha marrom na parte aérea, e) mancha no colo

As raízes, em sua maioria, mostraram pouca ou nenhuma infecção (dados não apresentados). Essa ausência de sintomas infere que a maior fonte de contaminação das raízes pode não ser oriunda de sementes infectadas e sim de solos contaminados. Segundo Reis (1982), o inoculo da podridão comum de raízes provem principalmente de conídios presentes no solo.

Com base nos resultados obtidos, foram observadas diferenças quanto à virulência entre os isolados. Os isolados considerados de mais alta virulência foram 98003 e 98010, ambos do grupo III, que resultaram em apenas 2% de emergência, das quais 100% das plântulas apresentaram sintomas típicos de infecção. Seguidos a estes vieram os isolados 98030 e 98012, pertencentes ao grupo I, com 4% e 5% de germinação. Estes dados não se relacionaram aos encontrados para a atividade enzimática, já que os isolados que apresentaram mais alta virulência não foram os melhores produtores de nenhuma das enzimas analisadas. Isolados como 98017 e CS1110, ao contrário, mostraram boa produção enzimática e baixos níveis de infecção, se comparados aos demais. Os isolados menos virulentos foram CS1110 e 98006, que apresentaram, respectivamente, 86% e 80% de emergência, das quais todas as plântulas não apresentaram sintomas. Estes isolados apresentavam micélio branco e não produziram estruturas reprodutivas em meio de cultura. A ausência de melaninas poderia ser um fator importante na baixa patogenicidade destes isolados, já que esses pigmentos, embora não estejam diretamente relacionados à patogenicidade, são importantes na proteção dos organismos no meio ambiente.

Além disso, é relatada em alguns fungos fitopatogênicos a necessidade de apressórios melanizados para a invasão do hospedeiro (Henson et al., 1999).

Segundo Bettiol & Ghini (2002), estes isolados de baixa virulência seriam importantes, uma vez que de acordo com estes autores linhagens avirulentas ou hipovirulentas poderiam ser utilizadas na indução da resistência sistêmica, pois podem colonizar a planta sem causar doenças, sendo reconhecidos pela planta, que ativaria o seu sistema de defesa, impedindo o estabelecimento de patógenos. Também poderia haver competição com o patógeno pelo nicho ecológico, diminuindo a chance da linhagem patogênica colonizar o hospedeiro. Isto já vem sendo utilizado em alguns vegetais, como o tomateiro, onde o patógeno *Fusarium oxysporum* é controlado por linhagens avirulentas que colonizam endofiticamente o hospedeiro, impedindo a entrada de linhagens virulentas (Esposito & Azevedo, 1998).

Os isolados de coloração cinza e crescimento algodonoso (grupo III) e os de coloração negra com setores (grupo I) mostraram-se os mais patogênicos. Oliveira et al. (1998) desenvolveram um estudo da variabilidade patogênica e morfológica de *B. sorokiniana*, encontrando diferenças quanto a patogenicidade, porém esta não pôde ser correlacionada às características morfológicas. Jaiswall et al. (2007) obtiveram resultados semelhantes ao presente estudo, encontrando correlação entre a patogenicidade e a morfologia colonial, no qual os isolados de coloração negra também mostraram-se mais patogênicos. Da mesma forma, Pandey et al. (2007) estudaram a variabilidade clonal de isolados de *B.*

sorokiniana, onde também foi possível relacionar a variabilidade morfológica com a patogenicidade.

Os resultados sugerem que o local de origem pode ser um fator importante na variação da virulência entre os isolados do fungo, visto que os isolados mais virulentos foram obtidos de variedades do Rio Grande do Sul, enquanto os isolados provenientes de outros países mostraram-se menos virulentos. Cabe ainda ressaltar que as sementes de trigo utilizadas para o teste da virulência pertenciam ao cultivar BRS Buriti, própria para o plantio de trigo no Rio Grande do Sul. As exceções para tais observações foram os isolados 98006 e 98040 que, embora provenientes do Rio Grande do Sul, apresentaram os menores níveis de virulência.

Assim, as avaliações indicam que há variação quanto à virulência de isolados de diferentes hospedeiros, de diferentes regiões geográficas e até mesmo da mesma cultura. Tais observações podem ser explicadas por fatores externos, como as diferenças edafoclimáticas das regiões de onde os isolados procederam, ou internos, em que um isolado dentro da mesma espécie difere de outro devido à sua composição genética. Lilly & Barnett (1951) afirmam que entre fungos a diversidade é uma norma, enquanto a uniformidade é uma exceção em relação ao comportamento entre espécies e isolados. O fato do isolado de um determinado hospedeiro mostrar-se pouco agressivo para o mesmo hospedeiro pode ser explicado pela variação da cultivar, do local de origem do isolado em relação a do hospedeiro testado e da variabilidade genética entre isolados obtidos do mesmo hospedeiro.

Arabi & Jawhar (2004) estudaram diferenças na virulência de isolados de *Cochliobolus sativus*, encontrando três diferentes patótipos, sendo um deles extremamente virulento. Os autores atribuíram tais diferenças às interações genóticas e aos diferentes genes de virulência operando nos patossistemas. Farias et al. (2005) realizaram uma avaliação dos fungos causadores de helmintosporiose em aveia. Dentre seis espécies, *B. sorokiniana* foi o mais agressivo, tanto na redução da germinação como na morte de plântulas inoculadas. Independente de *B. sorokiniana* ser um fungo de reprodução predominantemente assexuada, haplóide e heterocariótico, a variabilidade observada na virulência dos isolados estudados sugere que ocorre uma extensiva troca genética nesta espécie. Isto pode ser justificado por este fungo possuir vários núcleos, tanto no micélio quanto nos conídios.

Desta forma, características diferenciadas poderiam ser expressas dependendo da informação genética contida nos núcleos presentes em cada célula heterocariótica do patógeno, interagindo com um determinado genótipo do hospedeiro. Além disso, a variação pode ser gerada quando a troca de núcleos é seguida pela fusão nuclear, recombinação somática e conseqüente rearranjo dos cromossomos pela haploidização.

Tabela 3 - Virulência de isolados de *B. sorokiniana* em sementes e plântulas de trigo.

ISOLADO	EMERGÊNCIA (%)	PLÂNTULAS (%)		SEMENTE		FOLHA		COLO
		COM SINTOMAS	SEM SINTOMAS	NÃO GERMINADA	GERMINADA	MANCHA MARROM	CLOROSE	
98003	2	100	0	100	100	100	0	100
98004	66	61	39	100	58	6	0	61
98006	80	0	100	100	0	0	0	0
98007	10	90	10	100	100	90	0	100
98010	2	100	0	100	100	100	0	100
98011	50	72	28	100	72	20	16	11
98012	5	80	20	100	80	80	40	80
98013	74	78	22	100	57	0	0	62
98014	25	72	28	100	72	24	8	12
98017	48	63	37	100	63	0	2	4
98018	56	100	0	100	100	16	0	64
98019	68	21	79	100	15	0	1	0
98021	42	90	10	100	90	38	0	86
98022	34	71	29	100	71	24	6	47
98023	11	64	36	100	64	36	27	45
98025	44	95	5	100	95	41	9	77
98026	74	51	49	100	38	5	5	41
98028	56	100	0	100	79	16	11	79
98029	26	100	0	100	62	38	19	92
98030	4	75	25	100	100	100	0	100
98032	54	100	0	100	89	17	13	59
98033	20	70	30	96	70	10	0	25
98040	68	56	44	100	35	0	0	38
98041	10	90	10	98	90	10	0	90
98042	40	100	0	100	90	33	25	85
98043	34	100	0	100	38	29	24	88
19/92	72	22	78	100	40	0	0	22
CV13	44	100	0	100	100	18	2	86
BS6M1	68	68	32	100	68	0	0	0
CS1004	70	83	17	100	77	3	0	54
1965	76	61	39	100	61	5	0	42
BS18M2	40	95	5	100	100	55	25	95
BS52M1	50	92	8	100	76	16	0	56
CS1110	86	0	100	100	0	0	0	0
BS16M1	46	90	10	100	90	26	4	61
controle	99	0	100	0	0	0	0	0

O teste de análise variância (ANOVA) foi realizado com o objetivo de verificar se os diferentes grupos diferiam estatisticamente quanto aos efeitos na germinação e na porcentagem de plântulas com sintomas e sem sintomas. Os resultados mostraram que a diferença observada na emergência não era significativa, enquanto que em plântulas com e sem sintomas, houve diferença estatística. Para estes dados, foi realizado o pós-teste de Tuckey, onde os grupos 3 e 5 diferiram tanto pelo efeito em plântulas com sintomas, como para plântulas sem sintomas.

4.4 Extração de proteínas e eletroforese em gel de poliacrilamida

Os géis de poliacrilamida SDS-PAGE foram analisados com base no número, tamanho e intensidade da coloração das bandas de proteínas no gel, sendo selecionadas apenas as bandas de intensidades fortes e reprodutíveis.

Os padrões de bandas relativos aos diferentes isolados de *B. sorokiniana* e ao isolado de *B. oryzae* mostraram variação quanto ao número e intensidade das bandas (Figura 17). Diferenças foram encontradas entre isolados pertencentes ao mesmo grupo morfológico e também de mesma região geográfica. Os perfis proteicos dos isolados provenientes de outros países foram bastante distintos, com exceção dos isolados 1965 e CS110, provenientes, respectivamente, da Dinamarca e Bangladesh, que apresentaram perfis bastante semelhantes (figura 17-c).

Entre os isolados, foram verificadas bandas em comum, mostrando uma relação intraespecífica. Duas bandas entre 43 e 41Kda ou quatro bandas entre 43 e 35 KDa foram comuns a grande parte dos isolados brasileiros de *B. sorokiniana*, além de duas bandas entre 19 e 17 KDa (figura 17-a e 17-b), podendo ser uma característica dessa espécie.

O isolado 98006 apresentou crescimento lento nas condições de cultivo de 10 dias utilizadas neste estudo. Para solucionar este problema, a mesma proporção de micélio em tampão de extração foi mantida. Entretanto, a pouca disponibilidade de massa micelial dificultou os procedimentos de extração de proteínas totais deste isolado. O isolado de BO2002 de *B. oryzae* se distinguiu dos demais por apresentar uma banda de cerca de 32 kDa de intensidade forte, a qual não foi observada em nenhum dos isolados de *B. sorokiniana*.

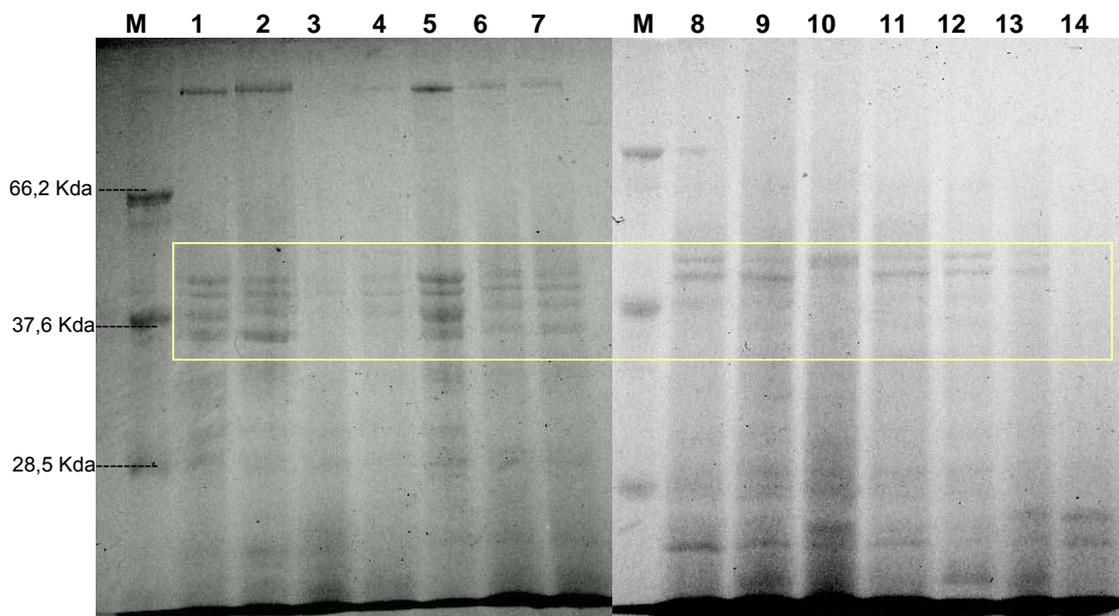


Fig. 17-a Perfis protéicos dos isolados de *B. sorokiniana* oriundos do Brasil. (M) marcador de peso molecular, (1) 98003, (2)98004, (3) 98006, (4)98007, (5)98010, (6)98011, (7)98012, (M)marcador de peso molecular, (8)98013, (9)98014, (10)98017, (11)98018, (12)98019, (13)98021, (14)98022

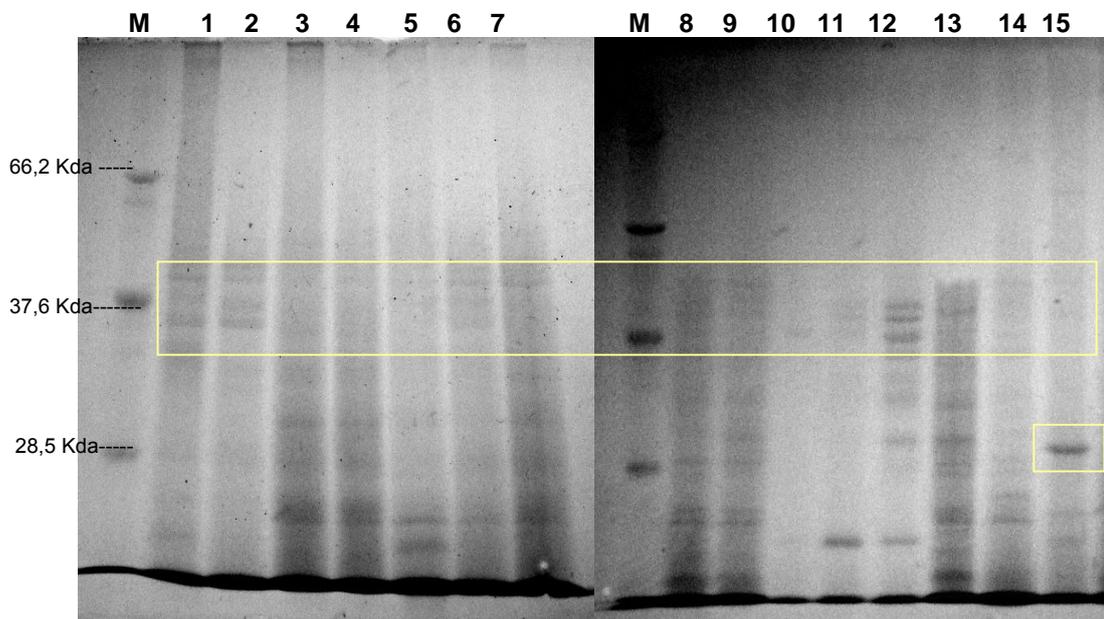


Fig. 17-b Perfis protéicos dos isolados de *B. sorokiniana* e do isolado de *B. orizae*, ambos oriundos do Brasil (M) marcador de peso molecular, (1)98023, (2)98025, (3)98026, (4)98028, (5)98029, (6)98030, (7)98032, (M)marcador de peso molecular, (8)98033, (9)98040, (10)98041, (11)98042, (12)98043, (13)19/92, (14)CV13, (15)BO2002

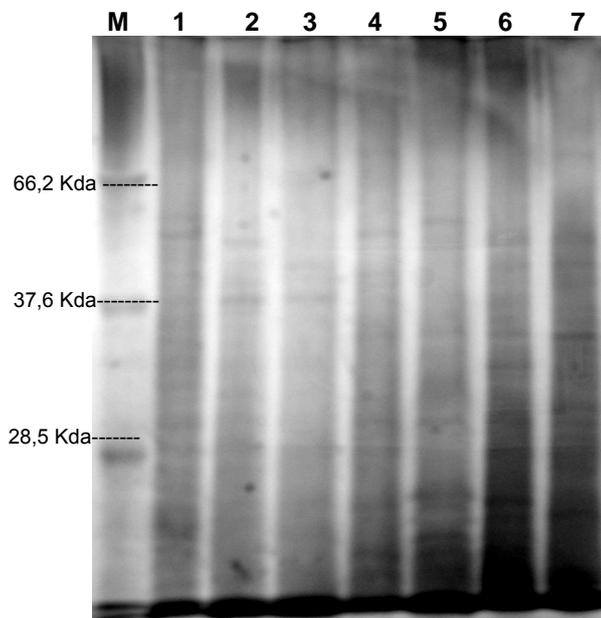


Fig. 17-c Perfis protéicos dos isolados de *B. sorokiniana* oriundos de outros países (M) marcador de peso molecular, (1)BS6M1, (2)BS16M1 (3)BS18M2, (4)BS52M1, (5)CS1004, (6)1965, (7)CS110

4.5 Avaliação da incompatibilidade vegetativa entre isolados de *Bipolaris sorokiniana*

O teste de incompatibilidade vegetativa foi realizado em meio BDA utilizando-se os cruzamentos entre isolados de *B. sorokiniana* conforme os agrupamentos obtidos por Nascimento e Van Der Sand (2007), baseados na similaridade genética utilizando PCR-RFLP das regiões ITS1 e ITS2 do DNA ribossomal, procurando, com isso, minimizar a variabilidade entre os isolados.

Foram realizados trinta e um cruzamentos entre os isolados, sendo as avaliações realizadas pela observação da região de encontro das hifas. Foram observados três diferentes comportamentos na região de encontro das hifas, o que permitiu classificar os cruzamentos em incompatíveis, compatíveis ou parcialmente compatíveis (figura 18). Dos 31 cruzamentos realizados, 18 foram classificados como totalmente incompatíveis, 4 como compatíveis e 9 como parcialmente compatíveis, como observado na Tabela 4.

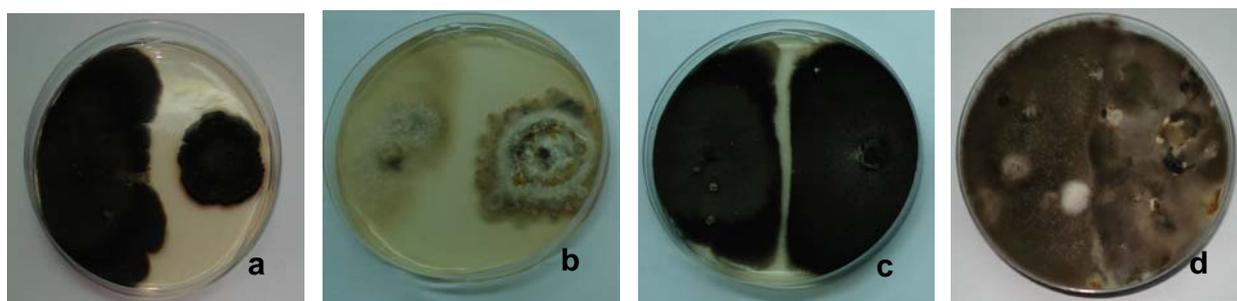


Fig. 18 - Avaliação da incompatibilidade vegetativa entre isolados A – Cruzamento incompatível entre os isolados BS52M1 e BS18M2, B- Cruzamento incompatível entre os isolados 98006 e 98019, C- Cruzamento parcialmente compatível entre os isolados CS1004 e 1965, D- Cruzamento compatível entre os isolados 98043 e BO2002.

Tabela 4 - Resultados dos testes de incompatibilidade dos isolados de *B. sorokiniana* com os cruzamentos realizados conforme os agrupamentos de similaridade das regiões ITS do DNA ribossomal baseados em PCR-RFLP

Isolados cruzados	Resultado
98003 - 98004	Incompatível
98003 - 98014	Incompatível
98004 - 98014	Incompatível
98007 - 98017	Parcialmente Compatível
98007 - 98026	Incompatível
98017 - 98026	Parcialmente Compatível
98006 - 98018	Compatível
98006 - 98019	Compatível
98018 - 98019	Incompatível
98011 - 98025	Incompatível
98040 - 19/92	Compatível
98043 - BO	Compatível
98029 - CV13	Incompatível
BS6M1 - CS1004	Incompatível
BS6M1 - 1965	Incompatível
CS1004 - 1965	Incompatível
98013 - 98042	Incompatível
98028 - 98032	Parcialmente Compatível
98028 - 98041	Incompatível
98032 - 98041	Incompatível
98010 - 98012	Parcialmente Compatível
98010 - 98023	Parcialmente Compatível
98010 - 98030	Parcialmente Compatível
98012 - 98023	Parcialmente Compatível
98012 - 98030	Incompatível
98023 - 98030	Parcialmente Compatível
98021 - 98022	Incompatível
BS18M2 - BS52M1	Incompatível
BS18M2 - CS1110	Incompatível
BS52M1 - CS1110	Parcialmente Compatível
98033 - BS16M1	Incompatível

Nos cruzamentos compatíveis foi possível observar a superposição das colônias e o encontro das hifas. Na análise sob o estereomicroscópio, foi visualizado a anastomoses de hifas. A fusão das hifas ocorria entre as hifas principais e secundárias, sendo observada também entre hifas paralelas, formando a estrutura do tipo H (Figuras 19-a e 19-c).

As anastomoses também ocorreram entre as extremidades de hifas e entre a extremidade de uma hifa e a parede lateral de outra (Figura 19-b). Além disso, também foram visualizadas fusões entre extremidades de hifas diferentes. Nos casos de cruzamentos compatíveis, considera-se que exista uma similaridade genética entre os isolados e uma provável origem geográfica comum, além haver também semelhantes atributos biológicos, fisiológicos e patogênicos (Glass et al., 2000).

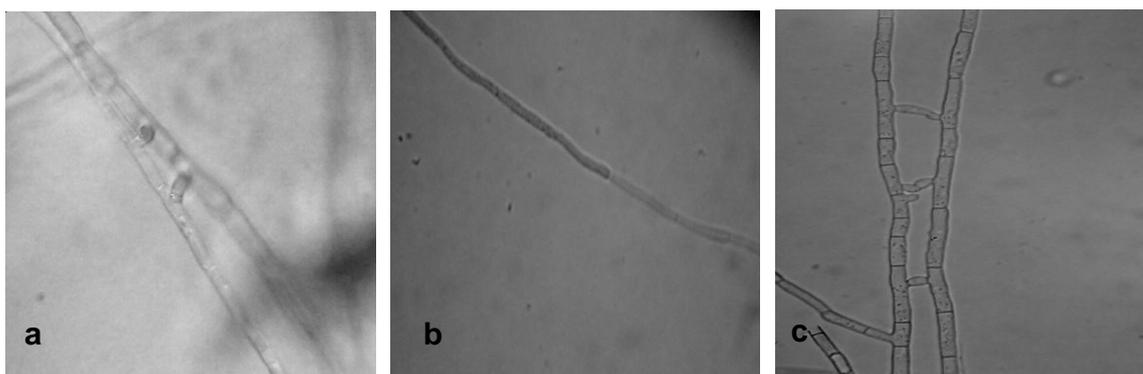


Fig. 19 - Anastomoses de hifas entre isolados de *B. sorokiniana*. a) anastomose do tipo H, b) anastomose entre extremidades hifais, c) anastomose do tipo H.

Já os cruzamentos incompatíveis foram caracterizados por zonas de aversão entre isolados, com a formação de halos entre os mesmos e sem encontro de hifas, indicando possível dissimilaridade genética. Glass et al. (2000) afirmam que um fungo filamentoso é limitado de formar um heterocário com outro fungo de constituição genética similar. Neste trabalho, os isolados cruzados apresentavam constituição genética semelhante, de acordo com os agrupamentos testados e foram impossibilitados de formarem heterocário. Fato interessante é que dentre diversas combinações realizadas entre isolados de *B. sorokiniana*, a grande maioria foi incompatível, enquanto os isolados BO2002 (*B. orizae*) e 98043, sendo de diferentes espécies, mostraram-se compatíveis quando cruzados, exibindo anastomoses. Os resultados encontrados neste estudo estão de acordo com o trabalho realizado por Slippers et al. (2001), que analisaram a incompatibilidade e ressaltam que reações antagônicas são comuns entre organismos mais relacionados do que entre organismos geneticamente mais distantes ou isolados geograficamente distantes.

Outra importante característica observada em cruzamentos entre fungos filamentosos incompatíveis é a fusão imperfeita, caracterizada por granulações citoplasmáticas das hifas fusionadas (Aimi et al., 2002). No presente estudo, não foram observadas granulações no citoplasma das hifas que apresentaram fusão celular.

Os resultados encontrados sobre a alta variabilidade e baixa ocorrência de anastomoses de hifas neste fungo evidenciam a importância de futuros estudos sobre a fase sexual deste microrganismo, já que a fusão de hifas é a fase que

precede a formação do heterocário, estrutura na qual ocorrem os processos de recombinação sexual e parassexual, responsáveis pela variabilidade genética em fungos filamentosos.

A fim de verificar geneticamente a incompatibilidade vegetativa foi realizada uma caracterização molecular das proteínas totais dos fungos. Após a eletroforese das proteínas totais em gel SDS-PAGE, as bandas foram analisadas e os perfis das proteínas comparados entre os isolados crescidos separadamente e na presença do outro isolado conforme grupo de similaridade de ITS 1 e 2 (Tabela 1). Foram selecionados 4 agrupamentos, sendo três formados por cruzamentos caracterizados como incompatíveis (Grupo 16, composto pelos isolados 98021 e 98022; grupo 13, composto pelos isolados 98013 e 98042 e grupo 9, composto pelos isolados 98029 e CV13) e 1 por cruzamentos classificados como compatíveis (grupo 8, formado pelos isolados 98043 e BO2002).

Analisando-se os perfis protéicos dos isolados, não foram observados polimorfismos das bandas dos isolados que cresceram isoladamente ou na presença de outro isolado. Porém, foram observadas bandas mais intensas nos isolados 98042 e 98013 quando cultivados na presença um do outro, sugerindo que algumas proteínas poderiam ser expressas em níveis mais elevados durante o co-cultivo dos isolados (figura 20)

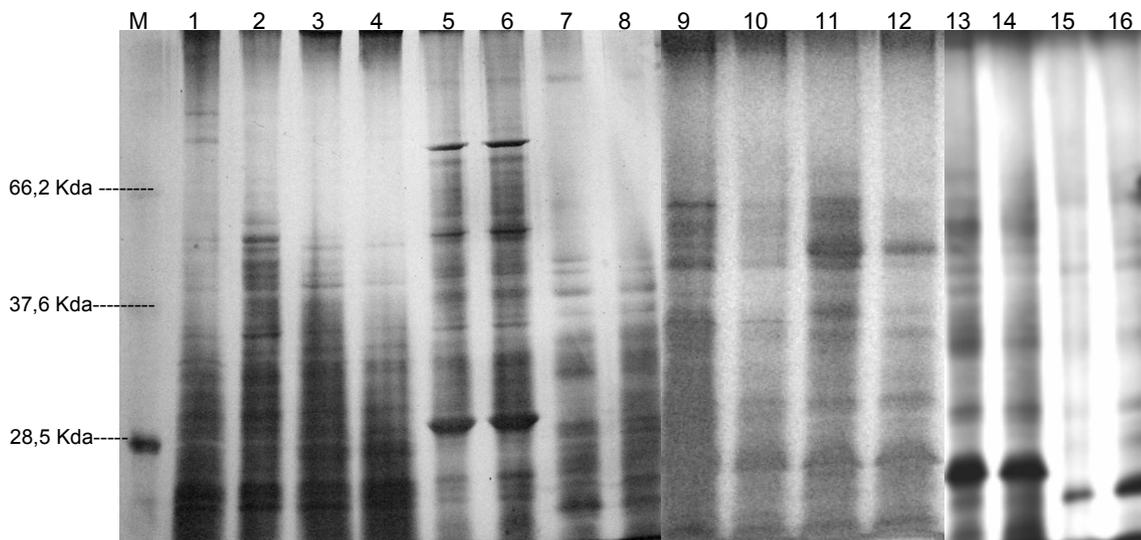


Fig. 20 - Perfis protéicos dos isolados crescidos isoladamente (I) e cultivados em co-cultivo com outros isolados do mesmo grupo ITS (CC). (M) marcador de peso molecular, (1)98021 CC, (2)98021 I, (3)98022 CC, (4)98022 I, (5)BO2002 CC, (6)BO2002 I, (7)98043 CC, (8)98043 I, (9)98042 CC, (10)98042 I, (11)98013 CC, (12)98013 I, (13)Cv13 CC, (14) Cv53 I, (15)98029 CC, (16)98029 I

4.6 Influência de diferentes meios de cultivo na manifestação da incompatibilidade

A influência do meio de cultivo na reação de incompatibilidade foi testada nos isolados 98003, 98010, 98033, BS52M1 e 19/92, provenientes de diferentes agrupamentos das regiões ITS do DNA ribossomal. Para este ensaio, os isolados foram confrontados em todas as combinações possíveis entre os isolados, com cinco diferentes meios de cultivo: BDA, Saboraud dextrose, ágar Czapek, ágar extrato de malte e agar-água. Como no teste anterior, as placas foram avaliadas na região de encontro das hifas e classificadas nas três reações discutidas anteriormente. Os resultados dos cruzamentos estão representados na tabela 5.

Analisando-se os resultados, foram verificados diferentes comportamentos entre os cruzamentos, conforme o meio de cultivo que foi utilizado. Entre todas as combinações realizadas nos diferentes meios de cultivo, nenhuma se apresentou totalmente compatível. Esse fato poderia ser explicado pela variabilidade genética entre os isolados, que foram provenientes de diferentes agrupamentos e, portanto, apresentavam uma grande distância genética entre si.

Tabela 5 - Cruzamentos de isolados de *B. sorokiniana* nos diferentes meios de cultivo utilizados.

Isolados Cruzados	Saboraud dextrose	Extrato de malte	Czapeck	BDA	Agar - água
98003 - 98010	PC	PC	PC		
98003 - 98033	PC	PC	PC	PC	
98003 - BS52M1	PC	PC	PC		
98003 - 19/92	PC	PC	PC	PC	
98010 - 98033	PC	PC			
98010 - BS52M1	PC	PC			
98010 - 19/92	PC	PC	PC		
98033 - BS52M1	PC	PC			
98033 - 19/92	PC	PC	PC	PC	
BS52M1 - 19/92	PC	PC	PC		

PC- Parcialmente compatível, I- Incompatível

Para entender a relação entre o meio de cultivo e a incompatibilidade, é necessário conhecer as características nutricionais e fisiológicas dos isolados e as características nutricionais dos substratos presentes nos meios de cultivo. O equilíbrio de fontes de C, N, P, vitaminas e micronutrientes na composição do

meio de cultura são fatores importantes para o crescimento, esporulação e manifestação ou não de determinadas características.

Os meios Saboraud dextrose e ágar extrato de malte apresentaram cruzamentos parcialmente compatíveis para todos os cruzamentos realizados. Já o meio ágar Czapek apresentou, entre os dez cruzamentos testados, três incompatíveis. O meio BDA, ao contrário, apresentou sete cruzamentos incompatíveis, enquanto todos os cruzamentos realizados no meio agar-água foram incompatíveis. Os isolados podem responder de formas distintas a diferentes meios de cultura, o que poderia justificar a resposta diferencial da incompatibilidade nos isolados nos meios de cultivo utilizados. Essa hipótese é seguida por Griffin (1994), que sugere que os diferentes nutrientes poderiam ser metabolizados em vias diferentes, levando à síntese de macromoléculas diferenciais, cujos compostos ou produtos poderiam interagir com o mecanismo de controle de biossíntese de moléculas.

O meio Saboraud é um substrato rico em açúcar e proteínas, tendo na sua composição glicose, peptona e ágar, o que favorece o crescimento micelial. Em contrapartida, a esporulação não foi favorecida neste meio, talvez pela ausência de algum fator necessário à formação de conídios. No fungo *Alternaria alternata*, a peptona, que contém todos os aminoácidos essenciais, já foi relatada como inibidora da formação de conídios (Silva & Melo, 1999).

O meio ágar extrato de malte é composto por extrato de malte, peptona e ágar, sendo, portanto, rico em açúcares como maltose e glicose, além de dextrina, proteínas, vitaminas e minerais. Já o meio ágar Czapek apresenta em

sua composição sacarose, nitrato de sódio, fosfato dipotássio, sulfato de magnésio cloreto de potássio, sulfato de ferro e ágar, sendo, portanto, um meio salino com limitada disponibilidade de nutrientes. Da mesma forma, o meio BDA, composto por batata, dextrose e ágar, caracteriza-se por permitir uma rápida esporulação. Isto, de certa forma poderia explicar ao reduzido crescimento micelial no meio BDA uma vez que a glicose do meio, embora sendo uma molécula prontamente utilizável, pode ter um efeito repressor e inibitório na utilização de outras fontes de carbono. Também a solanina presente no meio poderia estar afetando os processos de digestão, transporte e subsequente metabolização dos demais compostos desse meio, ocasionando o retardo do crescimento do micélio. Já o meio ágar-água seria o menos nutritivo dos cinco meios testados, fato evidenciado pelo baixo crescimento dos isolados e incompatibilidade na maioria dos cruzamentos.

Desta forma, pode-se sugerir que a incompatibilidade vegetativa, além de ter um caráter determinado geneticamente, seria também influenciada pela disponibilidade de nutrientes no meio de cultivo. No meio ambiente, isto teria fundamental importância, sugerindo que organismos que estivessem em um habitat rico em nutrientes poderiam não expressar a incompatibilidade. Em contrapartida, fungos que estivessem em ambientes estressantes fisiologicamente, competindo por nutrientes com outros microrganismos ou indivíduos da mesma espécie, poderiam utilizar este mecanismo para sua própria proteção, evitando a troca de informações genéticas que poderiam ser prejudiciais para os mesmos.

5. CONCLUSÕES

1) Foram obtidos 5 diferentes agrupamentos morfológicos com características e taxas de crescimento diferenciadas, sendo que os isolados dos grupos I e III mostraram-se os mais virulentos;

2) Os isolados apresentaram atividades enzimáticas distintas, que não puderam ser correlacionadas à virulência, sendo a enzima esterase a que apresentou os mais altos índices de atividade;

3) Foi encontrada uma alta frequência de reações de incompatibilidade vegetativa entre os isolados, que foi influenciada pelo meio de cultivo utilizado;

4) A análise do perfil proteico mostrou maior similaridade entre isolados de *B. sorokiniana* oriundos do Brasil do que entre isolados oriundos de outros países.

6. REFERÊNCIAS

AIMI, T.; YOTSUTANI, Y.; MORINAGA, T. Cytological analysis of anastomoses and vegetative incompatibility reactions in *Helicobasidium monpa*. **Current Microbiology**, Springer New York, v.44, n.2, p. 148-152, 2002.

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

ALFENAS, A. C.; PETERS, I.; BRUNE, W.; PASSADOR, G. C. **Eletroforese de proteínas e isoenzimas de fungos e essências florestais**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 242p.,1991.

ALMEIDA, L.C.C.; NIELLA, G.R.; BEZERRA, J. L. Efeito de remoções de partes doentes do cacauzeiro associadas a intervalos de aplicação de óxido cuproso no controle da vassoura-de-bruxa na Bahia. **Agrotropica**, Ilhéus, v.10, p. 95-102, 1998.

ALMGREN, I.; GUSTAFSSON, M.; FALT, A. S.; LINDGREN, H.; LILJEROTH, E. Interaction between root and leaf disease development in barley cultivars after inoculation with different isolates of *Bipolaris sorokiniana*. **Journal of Phytopathology**, Berlin, Blackwell, v.147, n.6, p.331-337,1999.

ALVES, I. T. G. **Aspectos da evolução da produção e da pesquisa de trigo no Brasil**. Campinas, 1991, 174 p. Tese (Doutorado em Economia), Faculdade de Economia, Universidade de Campinas, 1991.

ARABI M.I.E.; JAWHAR M. Identification of *Cochliobolus sativus* (spot blotch) isolates expressing differential virulence on barley genotypes in Syria. **Journal of Phytopathology**, Berlin, Blackwell,v. 152, p. 461–464, 2004.

ARABI, M. I. E., JAWHAR, M. Genetic variation among Syrian *Pyrenophora graminea* isolates as determined by protein profile analysis. **Advances in Horticultural Science**, v. 18, n.3, p. 132-137, 2004.

ARTIGIANI FILHO, V. H.; BEDENDO, I. P. Variabilidade de *Helminthosporium oryzae* detectada através da ocorrência de setores na colônia, sensibilidade a fungicidas, crescimento em diferentes meios de cultura e temperatura de incubação. **Summa Phytopathologica**, v.22, p. 217- 221, 1996.

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

BARBOSA, M.A.G.; REHN, K.G.; MENEZES, M.; MARIANO, R.L.R. Antagonism of *Trichoderma* on *Cladosporium herbarum* and their enzymatic characterization. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, p.98-104, 2001

BELLAHCENE, M.; FORTAS, Z.; FERNANDEZ, D.; NICOLE, M. Vegetative compatibility of *Verticillium dahlia* isolated from olive trees (*Olea europea* L.) in Algeria. **African Journal of Biotechnology**. V.4, n.9, p.963-967, 2005.

BERBEE, M.L.; PIRSEYEDI, M.; HUBBARD, S. Cochliobolus phylogenetics and origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase sequences. **Mycologia**, v.91, n.6, p.964-977, 1999

BETTIOL, W.; GHINI, R. Controle Biológico In: KIMATI, PEIXOTO NETO, P. A. de S.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Microrganismos endofíticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, n. 29, p. 62-76, 2002.

BOCCHESI, C. A. C. ; MARTINELLI, J. A. ; MATSUMURA, A. T. S. ; FEDERIZZI, L. C. ; PRESTES, A. M. Virulência, atividade enzimática e padrões de isoesterases de isolados de *Pyrenophora avenae*, agente etiológico da mancha de grãos e folhas de aveia. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, n. 1, p. 11-16, 2003.

BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Indicadores Agropecuários 1996-2003**. IBGE, 2005.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes**. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. Brasília, 365p, 1992.

CABI International. **Crop protection Compendium: Global Module**. Wallingford, UK, 2000. 1CD

CARROLL, G. Forest endophytes: pattern and process. **Canadian Journal of Botany**, Ottawa, v.73, p. S1316 – S1324, 1995.

CIMMYT 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 janeiro de 2008.

CHEREPENNIKOVA-ANIKINA, M. I. ; SAVENKOVA, L. V. ; DOLGOVA, A. V. ; SHAW, D. S. ; DYAKOV, Y. T. Vegetative incompatibility of *Phytophthora infestans*. **Journal of Russian Phytopathology Society** V.3, 2002

CHRISTENSEN, J.J. Physiologic specialization and mutation in *Helminthosporium sativum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.15, p.785-795, 1925.

COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO. **Indicações técnicas da Comissão Sul-Brasileira de pesquisa de trigo**. Trigo e triticales. 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>. Acesso em fevereiro de 2008.

COUTO, E. F. **Estudo comparativo de isolados de *Colletotrichum musae* através de caracteres patogênicos, enzimáticos, fisiomorfológicos e moleculares**. Recife, 2002, 87 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2002.

CUNHA, G.R.; BACALTCHUK, B.; BISOTTO, V. **Trigo: 500 anos no Brasil**. Brasília, Embrapa, 1999

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

CUNHA, G.R.; TROMBINI, M.F. **Trigo no Mercosul: coletânea de artigos**. Brasília, Embrapa, 1999.

CZACZYK K., STACHOWIAK B., TROJANOWSKA K., GULEWICZ K. Antifungal activity of *Bacillus* sp. Isolated from compost. **Folia Microbiologica**. v. 45, n.6, p. 552-554, 2000.

DAL BELLO, G.M.; MÓNACO, C.I.; CHÁVES, A.R. Efecto de los metabolitos volátiles de *Trichoderma hamatum* sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos procedentes del suelo. **Revista Iberoamericana de Micología**; v.14, p.131-134, 1997

DE BRITO, N.M. **Estudo da fisiologia e variabilidade genética de *Curvularia eragrostidis* na cultura do inhame.** Paraíba, 2006, 93 p. Dissertação (mestrado) Universidade federal da Paraíba, 2006.

DIANESE, J.C. **Patologia vegetal: agressão e defesa em sistemas planta-patógeno.** Brasília, Universidade de Brasília, 139 p., 1990.

DUVEILLER, E.; GARCIA ALTAMIRANO, I. Pathogenicity of *Bipolaris sorokiniana* isolates from wheat roots, leaves and grains in Mexico. **Plant Pathology**, Oxford, v.49, n.2, p. 235–242, 2000.

ELLIS, M.B. **Dematiaceous Hyphomycetes.** Kew, Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute (CAB), 608 p., 1971.

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

FARIAS, C. R. J.; DEL PONTE, E. M. ; LUCCA FILHO, O. A.; PIEROBOM, C. R. Fungos causadores de helmintosporiose associados às sementes de aveia-preta (*Avena strigosa*, Schreb.) **Revista Brasileira de Agrociências**, v.11, n.1, p. 57-61, 2005

FERREIRA, L.F.R. **Diversidade genética de isolados polispóricos de *Crinipellis pernicioso*.** Piracicaba, 2005, 59 p. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz., 2005.

FORCELINI, C.A.Tratamento de sementes de trigo no Brasil. In: Semana de Atualização em Patologia de Sementes. Piracicaba. **Anais: Patógenos em Sementes: Detecção, Danos e Controle Químico.** P.246-264. 1995

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

GERMANI, R.; WATANABE, E.; CARVALHO,J. L. V de; BENASSI, V. de T. **Curso de controle de qualidade tecnológica do grão e da farinha de trigo.** Rio de Janeiro, CTAA/EMBRAPA, 1998. 66p. (Apostila de curso).

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

GILLESPIE, J.H.; LANGLEY, C.H. A general model to account for enzyme variation in natural populations. **Genetics**, Pittsburgh, v.76, n.4, p.837-887, 1974

GLASS, N. L.; JACOBSON, D. J.; SHIU, P.K.T. The genetics of hyphal fusion and vegetative incompatibility in filamentous ascomycete fungi. **Annual Review Genetics**, v. 34, p.165-186, 2000.

GIOVANNETTI, M.; SBRANA, C.; STRANI, P.; AGNOLUCCI, M.; RINAUDO, V.; AVIO, L. Genetic diversity of isolates of *Glomus mosseae* from different geographic areas detected by vegetative compatibility testing and biochemical and molecular analysis. **Applied and environmental microbiology**, v.69, n.1, p.616-624, 2003.

GRIFFIN, D. H. **Fungal physiology**. 2ª edição. New York: John Wiley & Sons, 458p, 1994.

GUSEVA, N.N.; LEVITIN, M.M.; MIKHAILOVA, L.A. Genetic mechanisms of variability of phytopathogenic fungi. **Acta Phytopathol. Acad. Sci. Hung.** V.14, p. 441-447, 1979.

HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S. L. The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. **Mycologia**, v.67, p. 597-607, 1975.

HANCOCK, J.G. & MILLAR, R.L. Association of cellulolytic, proteolytic, and xylolytic enzymes with southern anthracnose, springs black stem, and *Stemphylium* leaf spot of alfalfa. **Phytopathology**, St. Paul, v. 55, p.356-360, 1965.

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

HANSON, H.; BORLAUG, N.E.; ANDERSON, R.G. **Trigo en el tercer mundo**. Mexico, Centro Internacional de Mejoramiento de Maiz y Trigo. P.1-11. 1985

HENNERBERT, G. L.; VANCANNEYT, M. Proteins in fungal taxonomy. In: Frisvad, J. C.; Bridge, P. D.; Arora, D. K. (Eds.) **Chemical fungal taxonomy**. New York: Marcel Dekker, p. 77-106, 1998.

HENSON, J.M., BUTLER, M.J., DAY, A.W. The dark side of the mycelium: melanins of phytopathogenic fungi. **Annual reviews**, v.37, p. 447-471, 1999.

HODGES, F.; CAMPBELL, D. A.; CHRISTIANS, N. Potential biocontrol of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Bipolaris sorokiniana* on the phylloplane of *Poa pratensis* with strains of *Pseudomonas* spp. **Plant Pathology**, v. 43, n.3, p. 500-506, 1994.

HÖFLING, J. F.; ROSA, E. A. R.; PEREIRA, C. V.; BORIOLLO, M. F. G.; RODRIGUES, J. A. O. Differentiation and numerical analysis of oral yeasts based on SDS-PAGE profiles. Influence of the culture media on the whole-cell protein extracts. **Brazilian Journal of Biology**, v. 61, n.3, p. 507-516, 2001.

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.

JAEGER K.E.; REETZ M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v.16, p.396–403, 1998.

JAISWAL, S. K.; SWETA; PRASAD, L. C.; SHARMA, S.; KUMAR, S.; PRASAD, R.; PANDEY, S. P.; CHAND, R.; JOSHI, A. K. Identification of molecular marker and aggressiveness for different groups of *Bipolaris sorokiniana* isolates causing spot blotch disease in wheat (*Triticum aestivum* L.). **Current Microbiology**, v. 55, n.2, p. 135-141, 2007.

JERNEJC, K.; CIMERMAN, A. Characteristics of Five *Aspergillus* Species, **Food Technology and Biotechnology**, v .39, n.4, p. 333–340, 2001.

KAHMANN, R.; BASSE, C. Fungal gene expression during pathogenesis-related development and host plant colonization. **Current Opinion in Microbiology**, v.4, p. 974-380, 2001.

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

KOLATTUKUDY, P.E. Enzymatic penetration of the plant cuticle by fungal pathogens. **Annual Review of Physiopathology**, v.23, p.223-250, 1985.

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

LASCA. C.C.; KRUPPA, P. C.; BARROS, B. C.; SCHIMIDT, J. R.; CHIBA, S. Controle de *Pyricularia grisea* e *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo mediante tratamento com fungicidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 68, n .1, p. 55-63, 2001.

LEALEM, F., GASHE, B. A. Amylase production by a gram-positive bacterium isolated from fermenting tef (*Eraglostis tef*). **Journal of Applied Bacteriology** v.77.p.348-352, 1994.

LILLY, V.G. & BARNETT, H.L. **Physiology of the fungi**. New Graw-Hill. 1951

LOPES-LLORCA, L.V.; CARBONELL, T. Characterization of Spanish strains of *Verticillium lecanii*. **Revista Iberoamericana de Micologia**. v.16, p.136-142, 1999.

LUZ, W. C.; BERGSTROM, G. C. Temperature-sensitive development of spot blotch in spring wheat cultivars differing in resistance. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 11, p. 197-204, 1986.

MAIA, M.M.D.; MORAIS, M.M.C. ; MORAIS, Jr, M.A. ; MELO, E.H.M.; LIMA FILHO, J.L. Production of extracellular lipase by the phytopathogenic fungus *Fusarium solani* FS1. **Revista de Microbiologia**, v.30, p.304-309, 1999.

MAREK, S.M.; WU, J.; GLASS, N.L.; GILCHRIST, D.G.; BOSTOCK, R.M. Nuclear DNA degradation during heterokarion incompatibility in *Neurospora crassa*. **Fungal Genetics and Biology**. V.40, p.126-137, 2003.

MAHMOUD, Y.A.G.; GAAFAR, R.M.; MUBARAK, H.M Genetic diversity among Nile Delta isolates of *Rhizoctonia solani* Kuhn based on pathogenicity, compatibility, isozyme analysis and total protein pattern. **Turkish Journal of Botany**, v.31, p.19-29, 2007.

MCCALLUM, B.D.; TEKAUZ, A.; GILBERT, J. Vegetative compatibility among *Fusarium graminearum* (*Gibberella zeae*) isolates from barley spikes in southern Manitoba. **Canadian Journal of Plant Pathology**, v.23, p.83-87, 2001.

MCKEEN W. E. Mode of penetration of epidermal cell walls of *Vicia faba* by *Botrytis cinerea*. **Phytopathology**, St. Paul, v.64, p.461-467, 1974.

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

MEHTA, Y.R. Produção de conídios, período de esporulação e extensão da lesão por *Helminthosporium sativum* nas folhas-bandeiras de trigo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.16, p.77-79,1981.

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

MUCHOVEJ, J. J.; MUCHOVEJ, R. M. C.; RIBEIRO NESIO, M. L.. Taxonomia de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. **Fitopatologia brasileira**, Brasília, v. 13, p. 211-223, 1988.

MULLER, M. V. G. ; SAND, S. T. V. D. ; GERMANI, J. C. The use of RAPD to characterize *Bipolaris sorokiniana* isolates. **Genetics and molecular research**, v. 4, n. 4, p. 642-652, 2005.

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

NASCIMENTO, E. J. M.; VAN DER SAND, S. T. Restriction analysis of the amplified ribosomal DNA spacers ITS1 and ITS2 of *Bipolaris sorokiniana* isolates. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 1-6, 2007.

NICHOLSON, R. L.; KUC, J.; WILLIAMS, E. B. Histochemical demonstration of transitory esterase activity in *Venturia inaequalis*. **Phytopathology**, St. Paul, v.62, p.1241-1247, 1972.

NWUFO, M.I.; FAJOLA, A.O. Production of amylolytic enzymes in culture by *Botryodiplodia theobromae* and *Sclerotium rolfsii* associated with the corn rots of *Colocasia esculenta*. **Acta Microbiologica Hungarica**, v. 35, p.371-378. 1988.

OLIVEIRA, A.M.R., MATSUMURA, A.T.S., PRESTES, A.M., MATOS, G.S. & VAN DER SAND, S.T. Variabilidade patogênica e morfológica em isolados de *Bipolaris sorokiniana*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 23, p.349-353, 1998.

OSÓRIO, E.A. **A cultura do trigo**. São Paulo, Globo, 1992.

PANDEY, S. P.; SHARMA, S.; CHAND, R.; SHAHI, P.; JOSHI, A. K. Clonal Variability and Its Relevance in Generation of New Pathotypes in the Spot Blotch Pathogen, *Bipolaris sorokiniana*. **Current Microbiology**, v.56, n.1, p.33-41, 2007.

PARK, C.S.; SAKAGUCHI, K.; KAKINUMA, M.; AMANO, H. Comparison of electrophoretic patterns of soluble proteins and isozymes of the red rot disease fungus *Pythium sp.* isolated from *Porphyra yezoensis* from Korea and Japan. **Fisheries Science**, v.66, n.6, p. 1158 – 1162, 2000.

PASCHOLATTI, S.F. Fitopatógenos: arsenal enzimático. In: BERGAMIN FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. (Ed.) **Manual de Fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, v.1, cap.19, p.343-364, 1995.

PASCHOLATI, S.F., YOSHIOKA, H., KUNOH, H., NICHOLSON, R.C. Preparation of the infection court by *Erysiphe graminis* f.sp. hordei: cutinase is a component of the conidial exudate. **Physiological and molecular Plant Pathology**, v.41, p.53-59, 1992.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C Efeito do tratamento de sementes com fungicida sobre o controle de doenças na parte aérea do trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p.515-520, 2003.

PIERO, R. M. D; PASCHOLATI, S. F. Produção de celulases por *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 26, p. 361-341, 2000.

POWELL, J.F.; VARGAS, J.M. Vegetative compatibility and seasonal variation among isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. **Plant Disease**, v.85, p.377-381, 2001.

PRATES, L.G., FERNANDES, J.M.C. Avaliando a taxa de expansão de lesões de *Bipolaris sorokiniana* em trigo. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.26, p.185-191, 2001.

RAD, M. M.; ZAINI, F.; PEZESHKI, M.; KORDBACHEH, P.; AKHOUNI, E. E.; EMAMI, M. The Protein Profiles of *Trichophyton rubrum* by SDS-PAGE. **Iranian Journal of Public Health**, v. 30, p. 71-72, 2001.

REIS, E.M. Sementes de trigo infectadas por *Helminthosporium sativum*: Fonte de inóculo para a podridão comum de raízes e seu controle pelo tratamento com fungicidas. **Summa Phytopatologica**, Piracicaba, v.8, p.29-38, 1982.

REIS, E.M. & CASA, R.T. **Patologia de sementes de cereais de inverno**. Passo Fundo, Aldeia Norte Editora, 88 p., 1998.

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.

ROCA M., M.G., MACHADO, J.D.C., VIEIRA, M.G.C., DAVIDE, L.C. & ROCHA, M.L. Compatibilidade sexual e vegetativa do complexo *Glomerella-Colletotrichum* associado a sementes de algodão. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.29, p.016-020, 2004.

RODRIGUES, E. A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J.R.; SCAPIM, C.A.; FIORI TUTIDA, A.C.G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Scientiarum Agronômica**, Maringá, v.28, n.2, p. 213-220,2006.

ROSA, R. C. T. ; MENEZES, M. Caracterização patogênica, fisiológica e morfológica de *Pseudocercospora musae*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 26, n. 02, p. 141-147, 2001.

ROSENDAHL, S.; BANKE, S. Use of isozymes in fungal taxonomy and population studies. In: Frisvad, I. C.; Bridge, P. D.; Arora, D. K. (Eds.) **Chemical fungal taxonomy**. New York: Marcel Dekker, p. 107-120, 1998.

SALGADO, A.P.S.; CARDOSO, M.G.; SOUZA, P.E.; SOUZA, J. A. ABREU, C.M.P.; PINTO, J.E.B.P. Avaliação da atividade fungitóxica de óleos essenciais de folhas de *Eucalyptus* sobre *Fusarium oxysporum*, *Botrytis cinerea* e *Bipolaris sorokiniana*. **Ciência Agrotécnica**, Lavras. V.27, n.2, p.249-254, 2003.

SARMA, B.K.; SINGH, U.P; SINGH, K.P. Variability in Indian isolates of *Sclerotium rolfsii*. **Mycologia**, v.94, p.1051-1058. 2002.

SILVA, C.M.M.S.; MELO, I.S. Requisitos nutricionais para o fungo *Alternaria alternata*. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.34, n.3, p.499-503, 1999

SILVEIRA, S.F.; ALFENAS, A.C. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia spp.* Patogênicos a *Eucalyptus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.1, p.33-41, 2001.

SLIPPERS B.; WINGFIELD M. J.; WINGFIELD B. D.; COUTINHO T. A. Population structure and possible origin of *Amylostereum areolatum* in South Africa. **Plant Pathology**, v. 50, p. 206-210, 2001.

SOUSA, C.N.A. **Relação das cultivares comerciais de trigo no Brasil de 1922 a 1997**. Passo Fundo, Embrapa-CNPT, 46p., 1997.

TANAKA, M. A. S., MENTEM, J.O.M. Comparação de métodos de inoculação se sementes de algodoeiro com *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* e *C. gossypii*. **Summa Phytopathologica**, Botucatu, v.17, p.218-231, 1991.

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

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

WETZEL, M.M.V.S.; URBEN, A.F. & FAIAD, M.G.R. Sobrevivência de *Phomopsis sojae* Lehmn em sementes de soja armazenadas. In: **Congresso Brasileiro de Fitopatologia**, 16, Belém, 1983. Resumos, Belém, 1983, p.102.

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

VIÉGAS, J.; GOMES DE OLIVEIRA, I.V.; AZEVEDO, J.L.; CZERMAINSKI, A.B. Variabilidade morfológica de isolados de *Cochliobolus sativus*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.17, p. 204, 1992.

WEIKERT-OLIVEIRA, R. C. B.; RESENDE, M. A.; VALÉRIO, H. M.; CALIGIORNE, R. B.; PAIVA, E. Genetic variation pathogens causing *Helminthosporium* diseases of rice, maize and wheat. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 27, n. 6, p. 639-643, 2002.

ZHANG, Z., YUEN, G.Y. Biological control of *Bipolaris sorankiniana* on tall fescue by *Stenotrophomonas maltophilia* strain C3. **Phytopathology**, St. Paul, v.89, p. 817– 822, 1999.

ZHONG, S.; STEFFENSON, B.J. Virulence and molecular diversity in *Cochliobolus sativus*. **Phytopathology**, St. Paul, v.91, n.5, 2001.

7. APÊNDICES

7.1 Listagem e composição dos meios de cultivo utilizados.

Meio de cultivo	Composição
Ágar batata dextrose (BDA)	4 g/L Infusão de batata, 20g/L dextrose, 15g/L ágar
Saboraud dextrose	40 g/L dextrose, 10g/L peptona, 15 g/L ágar
Ágar Czapek	30 g/L sacarose, 2 g/L NaNO ₃ , 1 g/L K ₂ HPO ₄ , 0,5 g/L MgSO ₄ , 0,5 g/L KCl, 0,01 g/L FeSO ₄ , 15 g/L ágar
Ágar extrato de malte	30 g/L extrato de malte, 5 g/L peptona, 15 g/L ágar
Ágar água	15 g/L ágar
Meio mínimo	6 g/L NaNO ₃ , 0,5 g/L KCl, 1,5 g/L KH ₂ PO ₄ , 0,5 g/L MgSO ₄ . 7H ₂ O, 0,01 g/L ZnSO ₄ , 0,01 g/L FeSO ₄ , 15 g/L ágar
Meio mínimo modificado para produção de pectinases	7 g/L K ₂ HPO ₄ , 2 g/L KH ₂ PO ₄ , 1g/L (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,1 g/L MgSO ₄ .7H ₂ O, 15 g/L ágar

7.2 Listagem e composição das soluções utilizadas

Solução	Composição
Brometo hexadeciltrimetilamônia a 1%	1 g Brometo hexadeciltrimetilamônia, 100 mL água
Vermelho congo a 0,1 %	1 g vermelho congo, 100 mL água
Lugol	10 g iodeto de potássio, 5 g cristais de iodo, 100 mL água destilada
solução saturada de (NH ₄) ₂ SO ₄	7,7g de (NH ₄) ₂ SO ₄ , 10 mL água
Rodamina B a 0,001%.	0,01 g Rodamina B, 1L água
Dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10%	10 g de SDS, 100 mL água
Persulfato de Amônio (APS) a 10%	10 g APS, 100 mL água
Tris-HCl	121,14 g Tris-base, 1000 mL água

Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 0,5 M	29,22 g EDTA ácido, 200 mL água
Tampão de extração de proteínas	SDS 1%, 9M Uréia, 25mM Tris-HCl pH 6,8, 1mM EDTA, 0,7M β-mercaptoetanol
Tampão de amostra 5X	0,2 mL Tris-HCl 1,5 M pH 6,8, 0,2 mL glicerol, 2% SDS, 0,1 mL bromophenol blue 1%, 1,5 mL água
Tampão de corrida 5X	9 g Tris, 43,2 g glicina, 3 g SDS, 1000mL água.
Acrilamida	30 g acrilamida, 1 g bisacrilamida, 100 mL água
Gel SDS-PAGE (separador) a 15%	7,5 mL acrilamida, 7 mL Tris-HCl pH 8,8, 0,190 μL SDS, 0,094 μL APS a 10%, 0,018 μL TEMED, 3,9 mL água
Gel SDS-PAGE (concentrador) a 4%	1,34 mL acrilamida, 1,3 mL Tris-HCl pH 6,8, 0,100 μL SDS, 0,050 μL APS a 10%, 0,010 μL TEMED, 7,2 mL água
Solução de fixação	50 mL de metanol, 12 mL de ácido acético, 50 μL de formaldeído, 38 mL de água
Solução aquosa de Comassie Blue a 1%	50% metanol, 0,05% comassie blue, 10% ácido acético, 40% água
Solução descorante	5% metanol, 7% ácido acético, 88% água
Solução de coloração de nitrato de prata	0,1 g AgNO ₃ , 38 μL formaldeído, 50 mL água
Solução de revelação	3 g carbonato de sódio, 25μL formaldeído, 1 mL tiosulfato de sódio 0,02%, 49 mL água

7.3 Análise de variância (ANOVA) – Virulência

EMERGÊNCIA

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
GRUPO 1	14	547	39,07142857	734,9945055
GRUPO 2	3	180	60	304
GRUPO 3	12	466	38,83333333	486,8787879
GRUPO 4	4	214	53,5	801
GRUPO 5	2	148	74	72

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3582,97619	4	895,7440476	1,493438141	0,229069649	2,689627574
Dentro dos grupos	17993,59524	30	599,7865079			
Total	21576,57143	34				

PLÂNTULAS COM SINTOMAS

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
GRUPO 1	14	1035	73,92857143	172,3791209
GRUPO 2	3	185	61,66666667	1362,333333
GRUPO 3	12	1113	92,75	119,6590909
GRUPO 4	4	221	55,25	2743,583333
GRUPO 5	2	56	28	1568

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	10301,97619	4	2575,494048	4,804848346	0,004082496	2,689627574
Dentro dos grupos	16080,59524	30	536,0198413			
Total	26382,57143	34				

PLÂNTULAS SEM SINTOMAS

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
GRUPO 1	14	365	26,07142857	172,3791209
GRUPO 2	3	115	38,33333333	1362,333333
GRUPO 3	12	87	7,25	119,6590909
GRUPO 4	4	179	44,75	2743,583333
GRUPO 5	2	144	72	1568

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	10301,97619	4	2575,494048	4,804848346	0,004082496	2,689627574
Dentro dos grupos	16080,59524	30	536,0198413			
Total	26382,57143	34				

7.4 TESTE DE TUCKEY - Patogenicidade

PLÂNTULAS COM SINTOMAS

GRUPO	3	1	2	4	5	
MÉDIA	92,75	73,93	61,67	55,25	28	
TAMANHO	12	14	3	4	2	
COMPARAÇÃO	XA - XB	nA:nB	EP	qcal c	Q0,05;5;30	Conclusão
3 x 5	64,75	12:02	12,47	5,19	4,1	DIFERE
3 x 4	37,5	12:04	9,4	3,99	4,1	NÃO DIFERE
3 x 2	31,08	12:03	10,48	2,97	4,1	NÃO DIFERE
3 x 1	18,82	12:14	6,34	2,97	4,1	NÃO DIFERE

1 x 5	45,93	14:02	$12,3_6$	3,72	4,1	NÃO DIFERE
1 x 4	18,68	14:04	9,26	2,02	4,1	NÃO DIFERE
1 x 2	12,26	14:03	$10,3_5$	1,18	4,1	NÃO DIFERE
2 x 5	33,67	03:02	$14,9_1$	2,26	4,1	NÃO DIFERE
2 x 4	6,42	03:04	$12,4_7$	0,51	4,1	NÃO DIFERE
4 x 5	27,25	04:02	$14,1_8$	1,92	4,1	NÃO DIFERE

PLÂNTULAS SEM SINTOMAS

GRUPO	3	1	2	4	5	
MÉDIA	92,75	73,93	$61,6_7$	$55,2_5$	28	
TAMANHO	12	14	3	4	2	

COMPARAÇÃO	XA - XB	nA:nB	EP	qcal c	Q0,05;5 ;30	Conclusão
5 x 3	64,75	12:02	$12,4_7$	5,19	4,1	DIFERE
5 x 1	45,93	14:02	$12,3_6$	3,72	4,1	NÃO DIFERE
5 x 2	33,67	03:02	$14,9_1$	2,26	4,1	NÃO DIFERE
5 x 4	27,25	04:02	$14,1_8$	1,92	4,1	NÃO DIFERE
4 x 3	37,5	12:04	9,4	3,99	4,1	NÃO DIFERE
4 x 1	18,68	14:04	9,26	2,02	4,1	NÃO DIFERE
4 x 2	6,42	03:04	$12,4_7$	0,51	4,1	NÃO DIFERE
2 x 3	31,08	12:03	$10,4_8$	2,97	4,1	NÃO DIFERE
2 x 1	12,26	14:03	$10,3_5$	1,18	4,1	NÃO DIFERE
1 x 3	18,82	12:14	6,34	2,97	4,1	NÃO DIFERE

7.5 Análise de variância (ANOVA) – Atividade enzimática (comparação entre enzimas)

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
AMILASES	36	36,41295228	1,011470897	0,028681859
CELULASES	36	38,3781019	1,066058386	0,008466812
PROTEASES	27	24,05471446	0,89091535	0,005151001
PECTINASES	22	22,47757144	1,021707793	0,015849937
ESTERASES	34	45,66954896	1,343222028	0,160582752

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	3,570797699	4	0,892699425	18,95003585	1,25E-12	3,446745
Dentro dos grupos	7,066208993	150	0,04710806			
Total	10,63700669	154				

7.6 Teste de Tukey – Atividade enzimática (comparação entre enzimas)

GRUPO	ESTERASES	CELULASES	PECTINASES	AMILASES	PROTEASES
MÉDIA	1,34	1,07	1,02	1,01	0,89
TAMANHO	34	36	22	36	27

COMPARAÇÃO	XA - XB	nA:nB	EP	qcalc	Q0,05;5;150	CONCLUSÃO
EST X PRO	0,45	34-27	0,04	11,250	3,917	DIFERE
EST X AMI	0,33	34-36	0,037	8,919	3,917	DIFERE
EST X PEC	0,32	34-22	0,042	7,619	3,917	DIFERE
EST X CEL	0,27	34-36	0,037	7,297	3,917	DIFERE
CEL X PRO	0,18	36-27	0,039	4,615	3,917	DIFERE
CEL X AMI	0,06	36-36	0,037	1,622	3,917	NÃO DIFERE
CEL X PEC	0,05	36-22	0,042	1,190	3,917	NÃO DIFERE
PEC X PRO	0,13	22-27	0,044	2,955	3,917	NÃO DIFERE
PEC X AMI	0,01	22-36	0,042	0,238	3,917	NÃO DIFERE
AMI X PRO	0,12	36-27	0,039	3,077	3,917	NÃO DIFERE

7.7 Análise de variância (ANOVA) – Atividade enzimática (comparação entre os diferentes isolados)

RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
BS6M1	5	4,877719197	0,975543839	0,016037265
CS1110	5	5,677358494	1,135471699	0,495468656
98003	4	4,201371814	1,050342954	0,011950745
CS1004	4	3,935076884	0,983769221	0,015459843
980044	5	5,292086073	1,058417215	0,009998571
BS16M1	5	5,390604826	1,078120965	0,023836082
BS18M2	4	5,118190705	1,279547676	0,082323494
98006	4	4,783777026	1,195944256	0,166558095
BS52M1	4	4,083998279	1,02099957	0,029181495
980077	5	5,040161575	1,008032315	0,00675004
98010	4	4,263394317	1,065848579	0,021834341
98011	4	5,502335148	1,375583787	0,307622669
1965	4	3,991664141	0,997916035	0,011818401
98012	5	5,516659309	1,103331862	0,016909757
98013	5	5,345625127	1,069125025	0,017992553
98014	3	3,355885948	1,118628649	0,006242225
98017	4	5,99882997	1,499707492	0,998032802
98018	5	5,249928544	1,049985709	0,023090416
98019	5	5,467682975	1,093536595	0,029832567
98021	5	5,264415896	1,052883179	0,019009664
98022	5	5,098672284	1,019734457	0,022738263
98023	5	5,497415177	1,099483035	0,043190721
98025	4	4,584788638	1,14619716	0,022826314
98026	4	4,003388922	1,00084723	0,025561936
98028	3	3,02431312	1,008104373	0,016199393
98029	5	5,631661173	1,126332235	0,035573439
98030	4	4,230220711	1,057555178	0,00595526
98032	3	2,981436224	0,993812075	0,025947069
98033	4	4,211659195	1,052914799	0,0084275
98040	5	5,605208451	1,12104169	0,054957201
98041	3	2,857371643	0,952457214	0,002522715
98042	3	3,112980769	1,037660256	0,010414741
98043	5	5,237914559	1,047582912	0,042461366
19/92	4	3,648791192	0,912197798	0,018547737
CEV13	5	5,047303576	1,009460715	0,009138583
BO2002	4	3,862997154	0,965749289	0,010342822

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,837083466	35	0,052488099	0,709788441	0,878263	1,806926
Dentro dos grupos	8,799923226	119	0,073948935			
Total	10,63700669	154				

7.8 Análise de variância (ANOVA) – Taxa de crescimento

RESUMO					
<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>	
GRUPO 1	14	10,2553	0,732521429	0,02023698	
GRUPO 2	3	2,6249	0,874966667	0,376239363	
GRUPO 3	13	13,2252	1,017323077	0,152374084	
GRUPO 4	4	3,8438	0,96095	0,068263263	
GRUPO 5	2	0,632	0,316	0,00060552	

ANOVA						
<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	1,178589959	4	0,29464749	2,99532401	0,033593	2,678668
Dentro dos grupos	3,049443783	31	0,098369154			
Total	4,228033742	35				

7.9 Teste de Tukey – Taxa de crescimento

GRUPO	3	4	2	1	5	
MÉDIA	1,017323	0,96095	0,874967	0,732521	<u>0,316</u>	
n	13	4	3	14	2	

COMPARAÇÃO	XA - XB	nA:nB	EP	qcalc	qcrítico	CONCLUSÃO
3 X 4	0,056373	13:04	0,1269	0,444232	4,102	NÃO
3 X 2	0,142356	13:03	0,1421	1,001804	4,102	NÃO
3 X 1	0,284802	13:14	0,0854	3,334914	4,102	NÃO
3 X 5	0,701323	13:02	0,1685	4,162155	4,102	DIFERE
4 X 2	0,085983	04:03	0,5357	0,160507	4,102	NÃO
4 X 1	0,228429	04:14	0,1257	1,817252	4,102	NÃO
4 X 5	0,64495	04:02	0,1921	3,357366	4,102	NÃO
2 X 1	0,142445	03:14	0,1411	1,009534	4,102	NÃO
2 X 5	0,558967	03:02	0,2025	2,760329	4,102	NÃO
1 X 5	0,416521	14:02	0,2443	1,704959	4,102	NÃO

8. VITA

8.1 DADOS PESSOAIS

Nome: Alana Poloni

Nascimento: 25/01/1983, Caxias do Sul/RS – Brasil

Filiação: Marlene Gallina Poloni e Adriano Poloni

Email: alanapo@gmail.com

8.2 FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2006-2008 - Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, Brasil.

2001-2005 - Graduação em Ciências Biológicas.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, RS, Brasil.

1998-2000 - Ensino Médio (2º grau).

Escola Estadual de 1º e 2º Santa Catarina, RS, Brasil.

1990-1997 - Ensino Fundamental (1º grau).

Escola Estadual de 1º e 2º Alexandre Zattera, RS, Brasil.

8.3 EXPERIÊNCIA PROFISSIONAL

2003-2005 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Estagiária de Iniciação Científica no Laboratório de Micologia Ambiental

2005 - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde, FEPPS

Estagiária do Laboratório de Análises Microbiológicas de Água e Alimentos

2002 – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Estagiária do Laboratório de Embriologia comparada