

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bipolaris sorokiniana*
USANDO ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DAS REGIÕES ITS1 E ITS2 DO DNA
RIBOSSOMAL AMPLIFICADO**

Ernandes Joel Moura do Nascimento

Biólogo – UFRGS

Porto Alegre (RS)

Julho de 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE *Bipolaris sorokiniana*
USANDO ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DAS REGIÕES ITS1 E ITS2 DO DNA
RIBOSSOMAL AMPLIFICADO**

Ernandes Joel Moura do Nascimento

Biólogo – UFRGS

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do Grau de
Mestre em Microbiologia Agrícola e do Ambiente

Porto Alegre (RS)

Julho de 2004

AGRADECIMENTOS

À Dr Sueli T. Van Der Sand, pela orientação, paciência, apoio e amizade.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, em especial, Dr. Gertrudes Corção, Marisa da Costa, Dr. Enilson Saccol de Sá e João Henrique Kanan pelas críticas, sugestões e amizade.

Aos colegas do curso e amigos, em especial, Daiane Bopp Fuentefria, Maria Viviane G. Muller, Anelise B. da Silveira, Gilvane Mattos e Agnes pelo auxílio, sugestões e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia.

Aos estagiários da escola Técnica da UFRGS, em especial, Vanessa, Adriana, Karina e Douglas, pelo auxílio e amizade.

Aos meus colegas de trabalho do Hospital de Pronto Socorro de Porto Alegre.

Aos meus irmãos, Adriano, Juliana e Jeane, pelo apoio e amizade.

À minha mãe, pelo amor, paciência e constante estímulo.

À todos que contribuíram para a realização deste trabalho.

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS DE *Bipolaris sorokiniana* USANDO ANÁLISE DE RESTRIÇÃO DAS REGIÕES ITS1 E ITS2 DO DNA RIBOSSOMAL AMPLIFICADO.^{1/}

Autor: Ernandes Joel moura do Nascimento
Orientadora: Dr Sueli Teresinha Van Der Sand

RESUMO

Bipolaris sorokiniana é um fungo fitopatogênico de gramíneas, sendo mais importante nas culturas de trigo e de cevada, ocasionando moléstias como a podridão comum da raiz, carvão do nó, ponta preta dos grãos e mancha marrom. No Brasil esse fitopatógeno encontra-se disseminado em todas as regiões tritícolas. O uso de sementes saudáveis ou tratadas adequadamente com fungicidas é de grande importância para o controle do fungo. O diagnóstico é dificultado pela grande variabilidade fisiológica e morfológica que o patógeno apresenta. O presente estudo teve por objetivos examinar a presença de polimorfismos intra-específicos das regiões do espaço transcrito interno (Spacer Transcribed Internal-ITS) do DNA ribossomal de isolados de *B. sorokiniana* e relacionar os padrões de polimorfismos com a região geográfica de origem dos isolados e com os diferentes tipos de hospedeiros. As regiões ITS1 e ITS2 do rDNA de 50 isolados de *B. sorokiniana* do Brasil e de outros países, um isolado de *B. oryzae* e seis de *Drechslera teres* foram amplificadas com oligonucleotídeos iniciadores universais ITS5-ITS2 e ITS3-ITS4. Os produtos da amplificação foram clivados com 18 endonucleases de restrição selecionadas e os polimorfismos foram analisados em gel não desnaturante de poliácridamida 8%. A análise dos produtos de amplificação revelou a presença de dois fragmentos para ambas as regiões ITS em todos os isolados. Dois isolados de *B. sorokiniana* apresentaram variabilidade intra-específica de ITS com um terceiro fragmento nesta região. A partir da análise dos dendrogramas da clivagem das regiões ITS, verificou-se que os isolados do Brasil e de outros países formaram grupos intra-específicos e grupos interespecíficos. *B. oryzae* agrupou-se com até 75% de similaridade na análise da região ITS1 e 72,7% na região ITS2 com isolados de *B. sorokiniana*. Um isolado de *D. Teres* apresentou índice de similaridade de ITS1 de 75% com amostras de *B. sorokiniana* isoladas de trigo. Em todos os dendrogramas analisados não foi possível agrupar os isolados por região geográfica ou por tipo de hospedeiro.

^{1/} Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (116 p). Julho de 2004.

Molecular characterization of *Bipolaris sorokiniana* isolates using restriction analysis of the spacers ITS1 and ITS2 of amplified ribosomal DNA.^{1/}

Author: Ernandes Joel de Moura Nascimento

Adviser: Dr. Sueli Teresinha Van Der Sand

Abstract

Bipolaris sorokiniana is a worldwide pathogen of many cereal grasses. It is the most important causal agent of common root rot, leaf spot disease, seedling blight and black point of wheat and barley. In Brazil this fungus is disseminated in all wheat producing regions. Since this fungus is a seed borne pathogen, it is a very important to use in plantation seeds free of the fungus or seeds properly treated with fungicide. Diagnose of the phytopathogen is a difficult task because its high morphological and physiological variability. The purpose of this study was to examine the intra-specific polymorphism of internally transcribed spacer (ITS) region in the ribosomal DNA (DNAr) of *Bipolaris sorokiniana* isolates and to determine if there is some relationship among the isolates and their geographic origin or host. DNAr from 50 *B. sorokiniana* isolates, from Brazil and other countries, one *B. oryzae* and six *Drechslera teres* were used for the amplification of the ITS region using the universal primers ITS5-ITS2 and ITS3-ITS4. The amplification products were digested with 18 selected restriction endonucleases and the polymorphism was analyzed in 8% no denaturing polyacrylamide gel. The results of the amplification products showed two fragments for each ITS regions in all isolates. Two *B. sorokiniana* isolates presented an intra-specific variability with a third fragment for the ITS1 region. The dendrogram analyses of the polymorphism's, generated with the digestions of ITS region, from isolates of Brazil and from the other countries showed an intra and inter-specific groups. *B. oryzae* showed 75% of similarity with some *B. sorokiniana* isolates in the polymorphism analysis of ITS1 region and 72, 7% of in the ITS2 region. In the same way in the ITS1 region, one *D. teres* isolate presented 75% of similarity for *B. sorokiniana* isolated from wheat. In all the dendrograms analysis there was not possibility to group the isolates accordingly to their geographic origin or host type.

^{1/}M.Sc Dissertation in Environmental and Agricultural Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (116 p). July, 2004.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 Aspectos econômicos da cultura do trigo e da cevada.....	12
2.1.1 A cultura do trigo.....	12
2.1.2 A cultura da cevada.....	17
2.2 O fitopatógeno.....	18
2.3 Moléstias, processo de infecção e patogenicidade.....	21
2.4 Variabilidade intra-específica.....	25
2.5 Técnicas moleculares para o estudo de fungos fitopatogênicos	27
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Origem dos isolados.....	33
3.2 Isolamento de <i>B. oryzae</i> a partir de sementes de arroz.....	37
3.3 Manutenção de culturas de <i>B. sorokiniana</i>	37
3.4 Preparo do micélio para Purificação do DNA genômico.....	38
3.5 Purificação do DNA genômico.....	40
3.6 Quantificação do DNA.....	40
3.7 Amplificação das regiões ITS (PCR-ITS).....	40
3.8 Clivagem com endonucleases de restrição dos produtos de amplificação	43
3.9 Eletroforese dos produtos da clivagem de fragmentos das regiões ITS.....	45
3.10 Cálculo do peso molecular dos fragmentos amplificados e produtos de clivagem.....	45
3.11 Análise estatística.....	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
4.1 Concentração de oligonucleotídeos iniciadores, BSA e cloreto de magnésio.....	47
4.2 Produtos de PCR das regiões ITS1 e ITS2.....	48
4.3 Análise da região ITS1 com endonucleases de restrição.....	53
4.4 Análise da região ITS2 com endonucleases de restrição.....	55
4.5 Análise dos dendrogramas de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil e de outros Países.....	64

4.5.1 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS1 dos isolados de outros países.....	64
4.5.2 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS1 dos isolados do Brasil.....	65
4.5.3 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS1 dos isolados do Brasil e de outros países.....	66
4.6 Análise dos dendrogramas de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países.....	71
4.6.1 Análise do dendrograma de ARDRA ITS2 dos isolados de outros países.....	71
4.6.2 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS2 dos isolados do Brasil.....	72
4.6.3 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países.....	74
4.7 Análise dos dendrogramas de ARDRA-ITS1 e ITS2 do de isolados do Brasil e de outros países.....	77
4.7.1 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS1 e ITS2 dos isolados de outros países.....	77
4.7.2 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS1 e ITS2 dos isolados do Brasil.....	78
4.7.3 Análise do dendrograma de ARDRA- ITS1 e ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países.....	83
5. CONCLUSÕES.....	92
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	93
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94
8. APÊNDICE.....	105

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
1. Isolados do Brasil utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2.....	34
2. Isolados de outros países utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2.....	36
3. Seqüência de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação das regiões ITS1 e ITS2.....	41
4. Reagentes utilizados em PCR-ITS.....	42
5. Sítios de clivagem reconhecidos pelas 18 endonucleases de restrição testadas.....	44
6. Padrões de fragmentos de clivagem da região ITS1 com as endonucleases de restrição <i>Hae</i> III, <i>Hha</i> I e <i>Hinf</i> I.....	54
7. Padrões de fragmentos de clivagem da região ITS2 com as endonucleases de restrição <i>Hae</i> III, <i>Hind</i> III, <i>Hha</i> I, <i>Hinf</i> I, <i>EcoR</i> I, <i>Msp</i> I e <i>Rsa</i> I.....	61

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
1. Região do rDNA com as regiões ITS1 e ITS2.....	41
2. Perfis de fragmentos não clivados da região ITS1 e ITS2.....	52
3. Perfis de fragmentos de ARDRA-ITS1 com a endonuclease <i>Hha I</i> de Isolados do Brasil.....	55
4. Perfis de fragmentos de ARDRA-ITS2 com a endonuclease <i>EcoR I</i> dos Isolados.....	62
5. Perfis de fragmentos de ARDRA-ITS2 com as endonucleases <i>Hind III</i> , <i>Msp I</i> e <i>Rsa I</i> dos Isolados	63
6. Dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados de outros países.....	65
7. Dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil.....	68
8. Dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil e de outros países.....	69
9. Dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados de outros países	72
10. Dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil	74
11. Dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países.....	80
12. Dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados de outros países.....	81
13. Dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países.....	82
14. Dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países.....	90

1. INTRODUÇÃO

Bipolaris sorokiniana (Sacc. In Sorok) Shoem. é um fungo fitopatogênico de centeio, cevada, aveia, trigo e outras gramíneas. No Brasil este patógeno é de grande importância para a cultura do trigo. Encontrando-se disseminado por todas as regiões tritícolas, ocasionando moléstias que recebem várias denominações como: podridão comum da raiz, mancha marrom, carvão do nó e ponta preta dos grãos.

A semente é a principal fonte de inóculo do fitopatógeno sendo responsável pelo estabelecimento de focos iniciais de doença nas lavouras. Uma vez que o aumento da intensidade do fitopatógeno na lavoura está relacionado com o uso de sementes infectadas, o emprego de sementes sadias ou tratadas adequadamente com fungicidas são medidas de grande importância para o controle do fungo. Para tanto, faz-se necessário o diagnóstico da presença de *B. sorokiniana* em sementes. O cultivo em laboratório é um dos métodos empregados na sua detecção, entretanto, o diagnóstico é dificultado pela grande variabilidade fisiológica e morfológica que o patógeno apresenta, além do longo tempo de cultivo necessário, para o desenvolvimento das estruturas reprodutivas que permitem identificá-lo.

Técnicas de biologia molecular como a análise das regiões do espaço transcrito interno (Internal Transcribed Spacer-ITS) do DNA ribossomal podem contribuir para o conhecimento da variabilidade intra-específica deste patógeno e para o estabelecimento de marcadores moleculares que permitam detectá-lo de maneira mais rápida e eficiente do que os métodos hoje adotados.

Para tanto o presente estudo teve por objetivos:

- Verificar a presença de polimorfismos intra-específicos das regiões ITS do rDNA de isolados de *B. sorokiniana*;
- Verificar a presença de polimorfismos interespecíficos entre os isolados;
- Verificar qual das regiões apresenta mais sítios para análise com endonucleases de restrição;
- Agrupar os isolados oriundos de diferentes regiões de acordo com os padrões de polimorfismos:
 - Relacionando os padrões de polimorfismos com a região geográfica de origem dos isolados;
 - Relacionando os padrões de polimorfismos aos diferentes hospedeiros dos quais foram obtidos os isolados.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Aspectos econômicos da cultura do trigo e da cevada

2.1.1 A cultura do trigo

Originário da Ásia, o trigo foi introduzido na Índia, na China e na Europa a 5000 mil anos A. C. (Picinini & Fernandes, 2000). Achados arqueológicos indicam que esse cereal foi o segundo grão cultivado, após a cevada, sendo de grande importância para o desenvolvimento da civilização ocidental, permitindo que a espécie humana abandonasse a caça e coleta para se fixar à terra e nela formar povoados e cidades (Cunha et al., 1999).

O trigo de panificação, *Triticum aestivum* L., é hoje a espécie mais cultivada, da qual são conhecidas mais de 20 mil variedades. Seu genoma é resultante da hibridização natural de três espécies diferentes, o que confere excepcional capacidade de adaptação às variadas condições ecológicas (Cunha et al., 1999).

As espécies conhecidas de trigo formam uma série poliplóide que consiste de três níveis diferentes de ploidia: diplóides ($2n=14$), tetraplóide ($2n=28$) e hexaplóide ($2n=42$). Assim, por exemplo, *T. monococcum* é um diplóide tipo AA, *T. turgidum* var. *durum* é um tetraplóide tipo AABB e *T.*

aestivum é um hexaplóide do tipo AABBDD. A combinação dos genomas completos de três espécies diplóides distintas, mas relacionadas geneticamente, faz com que muitos genes se apresentem triplicados, isto é, parte dos genes presentes em A podem estar repetidos nos genomas B e D (Moraes-Fernandes, 1982).

O melhoramento, cientificamente planejado, do trigo teve início na França há cerca de 200 anos. A partir daí, os países que dominaram a economia mundial são os mesmos que mais investiram em pesquisas de melhoramento genético. No Brasil, o trigo que foi introduzido pelos colonizadores europeus, teve dificuldades de adaptação devido a acidez do solo, moléstias fúngicas, entre outras. Através do melhoramento genético de cultivares, a maioria dessas limitações foram superadas. Atualmente, os trigos brasileiros são conhecidos por apresentarem os melhores genes, em nível mundial, para tolerância à acidez de solo e para resistência de planta adulta à ferrugem da folha e outras doenças fúngicas (Cunha et al., 1999).

O trigo é o cereal mais comercializado mundialmente, sendo plantado em aproximadamente 17% das terras cultivadas no mundo. Estima-se que as populações dos países em desenvolvimento consumam atualmente metade do trigo produzido e que daqui a dez anos esse consumo alcance 60%, podendo chegar em 2020 a uma demanda 40% maior daquela que é necessária atualmente (CIMMYT, 2000). Conforme dados preliminares da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, safra de 2002/2003 de trigo e outros grãos, verificou-se que o trigo é a 2ª cultura de grãos, em nível mundial, em produção sendo sobrepujado apenas pelo milho em 4,06% na safra de

2003 (Indicações Técnicas da Comissão Sulbrasileira de Pesquisa de Trigo-2003).

A China é o maior produtor mundial de trigo com cerca de 16,2% do total colhido. Os países da União Européia aparecem, segundo informações do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), em 2º lugar, porém individualmente, a posição é da Índia, seguida pela Rússia, Estados Unidos, Ucrânia, Paquistão, Turquia, Canadá, Argentina e Cazaquistão. As maiores produtividades do trigo são obtidas pelos países da União Européia. Os maiores exportadores são os EUA, Canadá, Austrália e Argentina. Este último sendo o 4º maior exportador mundial disputando o lugar com a União Européia como um todo. Estão entre os maiores importadores os países do norte da África, Japão, Brasil e Indonésia. O Brasil, conforme os dados do USDA (2003) nos últimos 3 anos tem sido o detentor da primeira posição entre os maiores importadores de trigo, mais ou menos 21,3 milhões de toneladas (Reunião da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2003).

Mundialmente, a classificação comercial do trigo é bastante variável. Existindo, contudo, duas classes: o “bread wheat” (trigo farinheiro) e o “durum” (trigo duro, também chamado de cristalino ou macarroneiro). A maioria do trigo semeado nos países em desenvolvimento é do tipo farinheiro (*T. aestivum*). A China, Índia e Turquia são os mais importantes produtores desse trigo. Quarenta por cento do trigo farinheiro é produzido em sistema irrigado com rotação de cultura arroz-trigo. Embora, também cresça em áreas secas com chuvas de monções (Centro Internacional de Melhoramento de Milho e Trigo (CIMMYT, 2000).

O trigo duro é cultivado em aproximadamente 17 milhões de hectares no mundo; sua produção está concentrada no Oriente Médio, Índia Central, Mediterrâneo, Oeste da Ásia, Norte da África, Etiópia, Argentina, Chile, Rússia, México, EUA, Itália, Espanha e Canadá (CIMMYT, 2000).

Os grãos do trigo duro são tipicamente maiores, mais pesados e duros que os do trigo farinheiro. A massa de trigo duro é menos elástica que a do trigo farinheiro e, portanto, comparativamente de inferior qualidade para a produção de pães. Contudo, a massa do trigo duro, por apresentar maior estabilidade ao cozimento, pois não tende a se desintegrar, é bastante utilizada na produção de espaguete, macarrão e raviole. Os trigos duros de boa qualidade têm em geral melhores preços no comércio internacional do que os melhores trigos farinheiros (Hanson et al., 1982).

No Brasil, a Instrução Normativa N°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 a tipificação do trigo. Segundo a instrução, são quatro as classes de trigo: o trigo Brando destinado à fabricação de bolachas, biscoitos, produtos de confeitaria, pizzas, massa caseira tipo fresca e ração; o trigo Pão é usado para panificação, massas alimentícias, “crackers” e para uso em mesclas com trigo Brando; o trigo Melhorador destina-se à fabricação de massas alimentícias, “crackers” e em mesclas com trigo Brando para panificação; e o trigo para outros usos, geralmente é aquele com grãos germinados, usado para ração. A tipificação do trigo varia de 1 a 3 conforme o grau de umidade, impurezas e danificação dos grãos (Cunha et al., 2000).

Quando se avalia o glúten presente nos grãos, via de regra, os trigos estrangeiros têm glúten de força média a alta, o que lhes confere boa qualidade física para panificação, especialmente pelo fato de produzirem pães de grande volume, entre outras boas características. Os trigos brasileiros, atualmente têm glúten de força suave a média, mas com boas características de panificação (Cunha et al., 1999).

Das 365 cultivares de trigo em cultivo comercial no Brasil, no período de 1922 a 1997, somente três pertencem à espécie *T. turgidum* var. *durum*, tendo sido lançadas no final desse período, as demais pertencem à espécie *T. aestivum*. Sessenta e cinco dessas cultivares foram obtidas através de cruzamentos com cultivares de outros países, sendo a maior parte dos cruzamentos realizadas com cultivares obtidos do México (Sousa, 1997).

O trabalho de seleção e de criação de cultivares no Brasil teve início em 1919. Desde então, o trigo tem sido a cultura de inverno mais importante no sul do Brasil. Atualmente, as unidades da Federação que produzem trigo por ordem de maior 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).

O auge da triticultura brasileira foi alcançado em 1987, quando foram semeados mais de 3,8 milhões de hectares, com a produção atingindo 6,2 milhões de toneladas (Cunha et al., 2000). Atualmente, o Brasil importa 70% do trigo necessário para suprir as suas necessidades de consumo interno. Enquanto a produção de trigo no País gira em torno de 3 milhões de toneladas, o consumo alcança quase 9 milhões de toneladas, o que requer a importação

de mais de 5 milhões de toneladas por ano, para suprir a demanda interna (Cunha e Trombini, 1999). A necessidade de importação deve-se à baixa produtividade devido às condições climáticas serem favoráveis ao desenvolvimento de doenças fúngicas, constituindo-se em fatores limitantes tanto para a produção quanto para a qualidade dos grãos colhidos (Torno, 1992). Em 12 anos de experimentação ocorreram perdas causadas por doenças na cultura do trigo de 44,61%, em média, equivalente a 1.152 Kg de trigo por ha (Cunha et al., 2000). Ressalta-se, entretanto, que atualmente o país tem condições de solo, clima, materiais genéticos, tradição agrícola e tecnologia disponível para cultivar mais de 10 milhões de ha. Medidas técnico-políticas buscam a recuperação da triticultura brasileira para, a médio prazo, produzir 60% da demanda nacional, estimada para 2005 em 11,2 milhões de toneladas (Reunião, 2003).

2.1.2 A cultura da cevada

A cevada (*Hordeum vulgare* sp. *vulgare*) é hoje o cereal mais antigo em cultivo e o 5º grão mais comercializado no mundo. A cevada cultivada originou-se no Oriente Médio, na região do Crescente Fértil. Abrangendo hoje, Israel, Jordânia, Síria, Turquia, Iraque e Irã. Esta surgiu da espécie selvagem *Hordeum spontaneum*. Atualmente, a cultivada e a selvagem pertencem à espécie *vulgare* como subespécies *vulgare* e *spontaneum*, respectivamente (Reunião Anual de Pesquisa de Cevada, 2001).

A maior produção de cevada é da União Européia, seguida dos Estados Unidos. Os maiores exportadores são: a União Européia, seguida pela Austrália, Ucrânia, Rússia e Canadá. Os maiores importadores são: Arábia Saudita, China, Norte da África, Japão e Leste Europeu. O Brasil, no período 1998/2003 participou com 0,7% das importações mundiais de cevada (Conab, 2003).

A cevada cultivada no Brasil destina-se quase que exclusivamente para fabricação de malte para a indústria cervejeira (85% do total), o restante é direcionado para ração animal (grãos de baixa qualidade) e para semente (Conab, 2003).

Atualmente, a indústria doméstica tem capacidade para produzir cerca de 300 mil toneladas anuais de malte. Esse volume representa apenas um terço do consumo atual de cerca de 1 milhão de toneladas/ano de malte, colocando o Brasil entre os maiores importadores de malte do mundo (Reunião, 2001).

A cevada, por ser um cereal de inverno mais precoce em relação aos demais, é uma importante opção de inverno para os produtores da Região Sul do país, podendo ser semeada e colhida mais cedo, liberando área e o maquinário para os cultivos de verão (Conab, 2003).

2.2 O fitopatógeno

Shoemaker (1959) dividiu o gênero *Helminthosporium* em três espécies: as que apresentavam conídios obclavados e que produziam tubos

germinativos no sentido dos pólos, formaram o gênero *Bipolaris*; e as que apresentavam conídios cilíndricos com germinação lateral foram separadas no gênero *Drechslera*; e permaneceram no gênero *Helminthosporium* as espécies que apresentam conidióforos retos, produzindo conídios por poros laterais e com conídios espessos na base e afilando no ápice. Finalmente, Leonard & Suggs (1974) separaram do gênero *Helminthosporim* as espécies que apresentavam hilo protuberante formando o gênero *Exserohilum* (Muchovej et al., 1988). Contudo, a segregação de *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum* do nome genérico *Heminthosporium* não é bem aceita universalmente (Alcorn, 1988). Tem sido sugerido que a sistemática adotada para a separação dos dois gêneros, *Drechslera* e *Bipolaris* foi inadequada (Hawksworth, 1986).

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

Bipolaris sorokiniana (Sacc. In Sorok.), teleomorfo: *Cochliobolus sativus* (Ito & Kuribayashi), pertence à subdivisão Deuteromycotina, classe Deuteromycetes, subclasse Hyphomycetidae, ordem Moniliales, família Dematiaceae (Alexopoulos & Mims, 1985). Os fungos pertencentes a essa categoria taxonômica são chamados de fungos imperfeitos, pois possuem apenas a reprodução assexuada (conidial) como forma de propagação da espécie.

Segundo as regras de nomenclatura botânica, quando um fungo apresenta as fases anamórfica e teleomórfica, utiliza-se o nome da forma

teleomórfica, podendo ser citado o nome da forma anamórfica entre parênteses. Mas, se o estudo fica restrito a fase conidial, adota-se somente o nome dado nessa fase (Costa, 1983).

Em condições naturais, a forma sexual (ascógena) *C. sativus* foi encontrada na Zâmbia em 1988, desde então não tendo sido reportada sua ocorrência em outras áreas do mundo (Kumar et al., 2002). Contudo, a forma teleomórfica pode ser produzida em laboratório na presença de material vegetal e outras condições especiais de cultivo (Ingram & Willians, 1988).

B. sorokiniana parasita uma ampla variedade de gramíneas, como: sorgo (*Sorghum sp.*), centeio (*Secale cereale*), aveia (*Avena sativa*), trigo (*T. aestivum*), cevada (*H. vulgare*) e outros cereais. Também tem sido relatado em feijão (*Phaseolus sp.*), alfafa (*Melilotus sp. e Melicago sp.*), trevo vermelho e amarelo (*Oxalis sp.*) (Tinline, 1988). É um patógeno de especial importância na cultura do trigo e da cevada, causando moléstias que recebem diferentes nomes de acordo com o órgão da planta que é afetado (Reis, 1982a).

O fitopatógeno sobrevive no solo ou em restos vegetais infectados. As células internas de alguns conídios que caem no solo se transformam em clamidósporos, auxiliando a sobrevivência do patógeno diretamente no solo na ausência do hospedeiro por longos períodos de tempo (Meronux & Pepper, 1968). Essa capacidade de permanecer no solo como esporo dormente consiste numa vantagem em relação a outros fitopatógenos necrotróficos que não sobrevivem sem a presença de restos culturais. Por essa razão e pelo fato de que algumas espécies de gramíneas silvestres suportam baixos níveis do fungo, é difícil eliminá-lo completamente das áreas agrícolas afetadas. *B.*

sorokiniana tem sido isolado de lesões radiculares de algumas gramíneas forrageiras, invasoras e nativas, tais como: azevém (*Lolium multiflorum*), fetusca (*Fetusca arundinacea*), capim-lanudo (*Holcus lanatus*), pensacola (*Paspalum saraurae*), capim-arroz (*Echinochloa cruzgalli*), capim-colchão (*Digitaria sanguinalis*) e de itapuã (*Brachiaria plantaginea*) (Müller, 2000).

2.3 Moléstias , processo de infecção e patogenicidade

B. sorokiniana pode atacar todos os órgãos da planta hospedeira durante toda a fase de desenvolvimento da cultura. Quando o fitopatógeno ataca os órgãos verdes da planta, interferindo com o processo fotossintético, a doença recebe o nome de mancha marrom, e quando ataca as raízes, interferindo na absorção de nutrientes e água, recebe o nome de podridão comum das raízes (Reis, 1982a).

No processo de infecção, o fungo passa por uma fase biotrófica de crescimento sobre o hospedeiro , caracterizada pela penetração da cutícula e da parede celular, seguida do desenvolvimento das hifas dentro das células da epiderme e uma fase necrotrófica onde ocorre a invasão do mesófilo e morte das células atacadas (Kumar et al., 2002). O fungo produz toxinas sesquiterpênicas sintetizadas a partir do farnesol. O pre-helmintosporol é o composto mais abundante e ativo, exercendo seu efeito inibitório sobre ATPase (Kumar et al., 2002). Essa mesma toxina tem propriedade anfipática que pode funcionar como um detergente, auxiliando no amolecimento da camada cerosa

da cutícula (Nilson et al., 1993). Outra toxina também importante é a helmintosporol que afeta a permeabilidade da membrana, fosforilação oxidativa, fotofosforilação e o bombeamento de prótons através da membrana plasmática (Kumar et al., 2002). Nakajima et al. (1994) isolaram de filtrados de cultura fúngica, um composto chamado “sorokianina” que apresenta efeito inibitório sobre a germinação de sementes de aveia.

Os sintomas da mancha marrom manifestam-se, inicialmente, em plúmulas originadas 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. Pode-se observar que plântula, em pré e pós-emergência, oriundas de lotes com alta incidência do fungo acabam morrendo. Nas folhas aparecem, primeiramente, pequenas manchas alongadas de cor marrom-escura à negra. As manchas bem desenvolvidas são tipicamente elípticas com abundante esporulação de cor escura, principalmente na parte central. Quando as lesões coalescem, a folha fica crestada, seca e morre prematuramente. Processo semelhante ocorre na espiga, onde as espiguetas infectadas, quando mortas, apresentam cor palha (cabeça branca), tornando-se negras quando houver frutificação do fungo. Lesões de cor castanho-escuras verificam-se nos nós e, às vezes, nos entrenós, pela presença dos conídios do fungo, sendo a doença denominada de carvão do nó. As lesões podem levar ao estrangulamento com conseqüente quebra e morte da planta. Os grãos formados nas espigas infectadas expõem o sintoma denominado ponta preta. Esse sintoma, nem sempre se manifesta, o

que torna as sementes, aparentemente sadias, em infectadas (Mehta,1978; Reis & Forcelini, 1993).

A mancha marrom, no Brasil, é considerada no compêndio de proteção de culturas como uma doença de grande impacto econômico, com elevada incidência e transmissão em sementes, variando de 60 a 90%, com tratamento de sementes e baixo risco geral (CABI, 2000). Por esse motivo, *B. sorokiniana* é o mais importante patógeno agregado á semente e, normalmente, o principal alvo do tratamento com fungicidas. O inóculo presente na semente é responsável pelo estabelecimento de inúmeros focos iniciais da mancha marrom a campo (Forcelini, 1991). Levantamentos sanitários de sementes comercializadas no Brasil têm demonstrado a presença constante de *B. sorokiniana* , cujos percentuais variam conforme o ano, o local e a cultivar, podendo chegar perto de 100% (Forcelini,1995). O tratamento com fungicidas das sementes infectadas somente é recomendado para lotes com incidência inferior a 30%, pois acima deste valor a eficiência do produto fica comprometida (Indicações Técnicas da Comissão Sul-Brasileira de Pesquisa de Trigo, 2001).

A associação patógeno-semente é um mecanismo eficiente de sobrevivência, pois através dela os patógenos necrotróficos não se separaram da principal fonte de nutrição, podendo esporular e se dispersar durante a germinação e emergência das plântulas em uma cultura recém estabelecida (Prestes, 1986; Reis, 1982a, 1982b).

No que se refere à resistência dos hospedeiros em geral, na cultura do trigo, as cultivares imediatamente após o seu lançamento apresentam maior

produtividade, pois ainda possuem resistência às doenças fúngicas. Porém, com o passar dos anos novas raças e variantes dos fungos surgem quebrando a resistência e reduzindo a produtividade (Cunha e Trombini, 1999).

Os métodos de controle desta e de outras doenças fúngicas são a rotação de culturas, eliminação de restos culturais, uso de cultivares resistentes e o uso de fungicidas. Este último, devido à facilidade de aplicação e os resultados imediatos obtidos os tornam amplamente difundidos. Porém o uso contínuo, tanto no tempo quanto no espaço, pode aumentar as chances de desenvolvimento de resistência de fungos fitopatogênicos. Extensas áreas tratadas com o mesmo ingrediente ativo aumentam a pressão de seleção. Quanto menor o tempo de cada geração do patógeno, mais freqüente é a necessidade de exposição ao fungicida e, maior o risco de resistência (Ghini & Kimati, 2002).

Em fevereiro de 1999 o Ministério da Agricultura e do Abastecimento instituiu, em nível nacional, o Programa de Sanidade de Pragas Não Quarentenárias Regulamentáveis na Produção e Comercialização de Sementes através da Portaria nº71, de 22/02/1999, visando a adoção de controle de qualidade em nível de campos de produção de sementes e análise laboratorial de sanidade de pragas não quarentenárias regulamentáveis, entre as quais *B.sorokiniana* faz parte.

2.4 Variabilidade intra-específica

As populações dos 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. Contudo, por sua vez, os patógenos são polimórficos para genes de virulência que podem quebrar a resistência do hospedeiro. Teoricamente 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 para virulência e resistência oriundos de populações distantes (Frank, 1992).

A variabilidade fenotípica envolvendo morfologia, síntese de metabólitos secundários e virulência, não são incomuns em fungos filamentosos. Esforços para explicar esse fenômeno têm levado ao estudo de elementos genéticos extracromossômicos, tais como, micovírus, plasmídeos, ou transposons em fungos. Vírus dsRNA relacionados à hipovirulência foram isolados de *Helminthosporium victoriae* em 1978 (Nuss & Koltin, 1990).

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

Christensen (1925), investigou a especialização fisiológica e mutação em *Helminthosporium sativum*, observando que setores mutantes diferiam na taxa de crescimento, cor, quantidade de micélio aéreo e patogenicidade. O mesmo autor em 1929 observou que a maioria dos setores mutados conservavam suas características culturais após passarem pelos hospedeiros vivos, fato que, segundo o autor, suporta a hipótese de que os setores sejam mutantes verdadeiros (Christensen, 1925).

Hansen (1938), observou a instabilidade cultural de fungos fitopatógenos 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. A esse fenômeno foi atribuído a variação na proporção de núcleos do tipo micelial e do tipo conidial no heterocário. Embora muitos esforços tenham sido feitos para explicar esse fenômeno, em termos de mutação de um só gene com estrita herança Mendeliana, algumas inconsistências permaneceram tais como: a alta taxa de mutação, ausência detectável de reversão, e uma freqüente associação da mutação com outras mudanças fenotípicas, incluindo a perda de patogenicidade (Klister & Miao, 1992).

Alguns fungos filamentosos possuem cromossomos supranumerários ou cromossomos "B" que contribuem para a variação da patogenicidade, pois carregam genes de virulência. Outros fenômenos também observados são a presença de elementos transponíveis (transposons) que podem ser transmitidos entre núcleos de um heterocário e de fatores

genéticos citoplasmáticos, RNAs citoplasmáticos e plasmídeos, que podem ser transferidos para diferentes linhagens por mecanismos não-Mendelianos (Klister & Miao, 1992).

Valim-Labres et al. (1997), investigaram a variação morfológica e a virulência de *B. sorokiniana*, concluindo que as características morfológicas não apresentam relação com a virulência. A grande variabilidade comportamental observada poderia ser explicada pela condição haplóide do fungo que impede que as alterações genéticas fiquem ocultas, assim elas são expressas no fenótipo.

Oliveira et al. (2002) estudaram a variabilidade genética intra-específica de *B. sorokiniana* através de RAPD. Dez isolados provenientes de trigo de diferentes regiões geográficas do Brasil foram inoculados em três cultivares de trigo com níveis diferentes de resistência a *B. sorokiniana* (resistente, moderadamente resistente e suscetível) sendo recuperados depois e analisados. Nesse estudo não foi possível estabelecer nenhuma relação entre a resistência do hospedeiro e os polimorfismos de DNA observados.

2.5 Técnicas moleculares para o estudo de fungos fitopatogênicos

Para o estudo de fitopatógenos, Ferron (1978) salientou que o uso de critérios morfológicos deve ser o primeiro passo de identificação, mas que algumas características morfológicas podem ser devidas a instabilidade do

isolado ou as condições de cultivo. Portanto, as análises fenotípicas devem ser confirmadas por métodos baseados em características genéticas.

A tecnologia da reação de polimerase em cadeia (PCR – “Polymerase Chain Reaction”) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80 (Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1987). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. A PCR é uma técnica que envolve a síntese enzimática de milhares de cópias de um segmento específico de DNA na presença da enzima DNA polimerase (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

O DNA ribossomal nuclear de eucariotos consiste de regiões codificantes para os genes do RNA ribossomal 18S, 5.8S e 28S, nos fungos a subunidade 28S é 25S, e dois espaços internos (ITS1 e ITS2) não codificantes separam estas regiões. O ITS1 está localizado entre as regiões 18S e 5.8S e o ITS2 entre as regiões 5.8S e 25-28S. As regiões 18S e 25-28S são muito conservadas e podem ser utilizadas para diferenciar em nível de gênero e espécie. Por outro lado, as regiões ITS acumulam mais variabilidade, sendo mais utilizadas na diferenciação de espécies e entre linhagens da mesma espécie.

A amplificação das regiões ITS(PCR-ITS) e seqüenciamento ou clivagem com endonucleases de restrição tem sido bastante utilizada no estudo de fungos. A técnica de análise com endonucleases de restrição de fragmentos amplificados das regiões ITS do rDNA (ARDRA-ITS, também referida como RFLP-ITS) consiste na amplificação por PCR de uma das

regiões ITS, das regiões ITS1 e ITS2 mais o fragmento 5.8S ou das duas regiões separadamente, seguida da clivagem do produto da amplificação com endonucleases de restrição. Os fragmentos resultantes são separados de acordo com seus tamanhos através de eletroforese em gel. Como as regiões ITS apresentam seqüências de bases variáveis que ficam entre seqüências de bases conservadas (18S, 25S e 5.8S) elas podem ser amplificadas utilizando oligonucleotídeos iniciadores universais, baseados nas seqüências conservadas. Os polimorfismos são evidenciados pelos fragmentos produzidos pelas endonucleases de restrição. Estes fragmentos podem ser de tamanho diferente nos indivíduos de uma população, caracterizando um polimorfismo (Loureiro, 1994). A base genética do polimorfismo observado resulta de mutações nos sítios de restrição ou de inserções, deleções e rearranjos entre estes sítios (Ferreira & Grattapaglia, 1995). A frequência com que os polimorfismos são detectados depende das endonucleases utilizadas e da diversidade genética do organismo em estudo (Michelmore & Hulbert, 1987).

Oliveira & Costa (2002) conseguiram separar com a endonuclease de restrição *Hae* III, através de ARDRA- ITS, as *formae speciales Phaseoli e glycines*, dentro do complexo *Fusarium solani*.

James et al (2000), estudaram a variação nas regiões ITS do rDNA de isolados de *Schizophyllum commune* de diferentes regiões geográficas, reunindo-os em três grupos: um da América do Norte e Central, um da América do Sul e Caribe, e outro formado pela Rússia, Japão e Austrália.

A variação interespecífica e intra-específica na região ITS de 44 espécies de 17 gêneros de fungos ectomicorrízicos de *Fennoscandia* foi

examinada através de RFLP-ITS por Karen et al. (1997). As regiões ITS mais o fragmento 5.8S foram amplificadas utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4, e os fragmentos foram clivados com 3 endonucleases de restrição. Os autores encontraram polimorfismos intra-específicos em 7 espécies. Utilizando apenas uma única endonuclease, foi obtido um único padrão de RFLP para mais da metade das espécies investigadas. Porém, pela combinação de diferentes endonucleases, 34 espécies puderam ser distinguidas umas das outras. As restantes ficaram agrupadas em um único gênero. A baixa variação intra-específica e alta variação interespecífica encontrada na região ITS permitiu que a maioria das 44 espécies pudessem ser reconhecidas (Karen et al., 1997).

Weikert-Oliveira et al. (2002), utilizaram RFLP-ITS para estudar a variação genética de fungos causadores de helmintosporiose em cereais. Vinte isolados de espécies de diferentes regiões geográficas, entre elas: *B. oryzae*, isolados de arroz; *B. sorokiniana* de trigo, *B. maydis* e *Exserohilum turcicum*, provenientes de milho, foram analisadas através da amplificação das regiões ITS1 e ITS2 mais o fragmento 5.8S. O produto da amplificação foi clivado com as endonucleases de restrição *Hind*III, *Hinf* I, *Hpa* II, *Alu* I, *EcoR* I, *Msp* I, *Rsa* I e *Hae* III. Os resultados revelaram a presença de polimorfismos interespecíficos e intra-específicos.

Os fungos *Venturia nashicola* e *V. pirina* são importantes patógenos de pêras. *V. nashicola* é agente causador da sarna em pêras japonesas e asiáticas, enquanto que *V. pirina* causa sarna em pêras européias. Tomando por base a seqüência de nucleotídeos do rDNA, ambas as espécies

são estreitamente relacionadas e muito diferentes das demais espécies do gênero *Venturia*. Desse modo, Le Can et al.(2001) realizaram um estudo para verificar se *V. nashicola* poderia ser em verdade uma raça de *V. pirina*. A combinação de RFLP-ITS foi utilizada para caracterizar as regiões ITS de 25 isolados de *V. nashicola* e *V. pirina*. Oligonucleotídeos específicos foram desenhados utilizando as seqüências de nucleotídeos obtidas do GenBank e os produtos da amplificação das regiões ITS com os oligonucleotídeos iniciadores ITS1 e ITS4 foram clivados com endonucleases de restrição *Taq* I, *EcoR* I, *Msp* I, *Tsp50091* e *Rsa* I. Diferentes padrões de clivagem foram obtidos entre as duas espécies com as endonucleases de restrição *Rsa* I, *Taq* I, e *Msp* I, o que permitiu diferenciar *V. pirina* de *V. nashicola* (Le Cam et al., 2001).

Noventa e cinco isolados de *Tilletia controversa* (causador de “dwarf bunt “ em trigo), *T. tritici*, *T. laevis* e *T. fusca* (causadores de “common bunt” em trigo), foram analisados por Polimorfismo de DNA Amplificado ao acaso (RAPD) e marcadores de rDNA. Dois grupos distintos (RI e RII) com 12% de similaridade foram obtidos utilizando-se vinte e cinco marcadores de RAPD. A análise da região ITS2 foi realizada com o conjunto de oligonucleotídeos ITS3/ITS4 e o RFLP foi realizado com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Msp* I, *Taq* I. A clivagem dos produtos da amplificação com as três endonucleases de restrição produziu 2 padrões distintos de RFLP, designados de A e B. O haplotipo A incluiu 24 isolados dos 28 de *T. controversa* e o haplotipo B compreendeu os quatro isolados restantes e todos os isolados das demais espécies. O que sugere que os fungos de “dwarf bunt’ e “common bunt”

descendem de um ancestral comum que subsequenteiramente diferenciou-se em duas sublinhagens (Shi et al., 1995).

Embora diversas técnicas de biologia molecular sejam usadas para estudar a variabilidade genética em fungos, ainda são poucos os trabalhos realizados com *B. sorokiniana* e pouco se conhece sobre sua diversidade genética. A análise das regiões ITS do rDNA com endonucleases de restrição pode fornecer informações importantes para o entendimento da estrutura genética dessa espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Origem dos isolados

Foram utilizados um total de 57 isolados, sendo 39 do Brasil e 18 de outros países. Trinta isolados de *B. sorokiniana* da coleção de isolados do laboratório de Microbiologia da UFRGS (obtidos de sementes de trigo fornecidas pelo CNPT- Embrapa - Passo Fundo). Dois isolados de *B. sorokiniana* de cevada cedidos pelo CNPT-Embrapa – Passo Fundo. Seis isolados de *Dreschlera teres* (da coleção do laboratório de Microbiologia da UFRGS, isolados de sementes fornecidas pela Maltaria Navegantes, Porto Alegre-RS) e um isolado de *B. oryzae* (isolado de sementes de arroz fornecidas pelo Instituto Riograndense de Arroz (IRGA (TABELA 1). Dezoito isolados de *B. sorokiniana* cedidos pelo CIMMYT- México (TABELA 2).

Tabela 1. Isolados de diferentes Estados do Brasil utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA.

Código do isolado	Procedência
98003*	Pelotas-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98004*	Cruz Alta-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98006*	Pelotas-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98007*	Cruz Alta-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98010*	Santa Rosa -RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98011*	Lagoa Vermelha-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98012*	Lagoa Vermelha-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98013*	Vitória-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98014*	Lagoa Vermelha-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98017*	Samambaia-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98018*	Vitória-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98019*	Taquá-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
1992*	Planaltina-GO (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98021*	Vitória-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98022*	Selbach-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98023*	Vitória-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98025*	Piratini-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98026*	Piratini-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98028*	Pelotas-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98029*	Piratini-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)

Cont. da tabela 1

98030*	Cruz Alta-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98031*	Nova Estância-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98032*	ENG. Beltrão-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98033*	Landai-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
0892*	Dourados-MS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
1792*	Catalão-GO (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98040*	Piratini-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98041*	Vitória-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98042*	Piratini- PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
98043*	Pelotas-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
CV13	Guarapuava-PR (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
CV48	Tapera-RS (CNPT-Embrapa - Passo Fundo)
Dt1	Piratini -RS (Maltaria Navegantes- Porto Alegre)
Dt2	São Gabriel-RS (Maltaria Navegantes- Porto Alegre)
Dt3	Vacaria -RS (Maltaria Navegantes- Porto Alegre)
Dt4	Sananduva-RS (Maltaria Navegantes- Porto Alegre)
Dt5	Palmeira das Missões-RS (Maltaria Navegantes- Porto Alegre)
Dt6	Encruzilhada do Sul-RS (Maltaria Navegantes- Porto Alegre)
BO2002	Depressão Central-RS (Instituto Riograndense do Arroz)

*Isolados de *B. sorokiniana* de trigo; CV, isolados de *B. sorokiniana* de cevada;

Dt, isolados de *D. teres*; BO, *B. oryzae*

Tabela 2. Isolados Provenientes de outros países utilizados na amplificação das regiões ITS1 e ITS2 do rDNA.

Código do isolado	Procedência
BS6M1	Altos de Jalisco - Jalisco-México (CIMMYT-México)
BS9	Guadalajara - Jalisco-México (CIMMYT-México)
BS16M1	Delicias- Chihuahua-México (CIMMYT-México)
BS18M2	Poza Rica- Veracruz-México (CIMMYT-México)
BS52M1	Monterrey- Nuevo Leon-México (CIMMYT-México)
104	Turquia (CIMMYT-México)
91	Turquia (CIMMYT-México)
B2	Turquia (CIMMYT-México)
A20	Saskatoon-Canada (CIMMYT-México)
1965	Copenhague – Dinamarca (CIMMYT-México)
CS1-13	Rampur-Nepal (CIMMYT-México)
CS11-10	Joydepur- Bangladesh (CIMMYT-México)
CS10-04	Hanoi-Vietnam (CIMMYT-México)
CF02-01	África do Sul (CIMMYT-México)
NRRL5851	África do Sul (CIMMYT-México)
1978*	França (CIMMYT-México)
1972*	Nil-Sant-Vicent- Bélgica (CIMMYT-México)
CM01-05	Poza Rica- México (CIMMYT-México)

*Isolados de *B. sorokiniana* de cevada

3.2 Isolamento de *B. oryzae* a partir de sementes de arroz

Foi realizada assepsia superficial das sementes para eliminação de fungos e bactérias indesejáveis presentes em sua superfície. A assepsia foi feita com hipoclorito de sódio 2%, deixando as sementes submersas por dois minutos, seguido de lavagem três vezes com água destilada esterilizada. As sementes foram transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura sólido BDA (8.1.1) e incubadas em estufa, tipo BOD (Demanda Biológica de Oxigênio) a uma temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12h, por um período aproximado de 9 dias. Após o período de incubação, as colônias puras foram analisadas através de microcultivo, fazendo-se a identificação das estruturas vegetativas e reprodutivas para identificação da espécie. As colônias puras de *B. oryzae* foram cultivadas em tubos de ensaio esterilizados contendo meio BDA inclinado e incubados em estufa BOD nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Depois da incubação os tubos foram transferidos para o refrigerador, ficando estocados a 4°C .

3.3 Manutenção de culturas de *Bipolaris sorokiniana*

Os isolados de *B. sorokiniana* foram cultivados em placas contendo meio BDA . Após o desenvolvimento das colônias foi realizado microcultivo para confirmar a identidade taxonômica do fungo. Uma vez confirmada, os isolados foram crescidos em tubos de ensaio contendo meio

BDA para serem estocados e conservados em geladeira a 4°C, renovando-se as culturas a cada seis meses.

3.4 Preparo do micélio para Purificação do DNA genômico

A massa micelial para purificação do DNA foi obtida inoculando-se uma porção de micélio, retirado com alça de platina estéril de tubos de ensaio do estoque de isolados, em Erlenmeyer contendo 300 mL de meio BD (8.1.2) em câmara de fluxo laminar. O período de incubação, em agitador orbital (120 rpm), para obtenção de aproximadamente 10 a 20 g de peso úmido de massa miceliana variou de 7 a 10 dias entre os isolados. Após esse período a massa miceliana de cada isolado foi filtrada e lavada por três vezes em água destilada esterilizada e o excesso de água foi retirado com um papel filtro esterilizado. O micélio foi pesado, macerado em um gral com a adição de nitrogênio líquido até obtenção de um pó fino para purificação de DNA.

3.5 Purificação do DNA genômico

Para este propósito foi utilizado o protocolo desenvolvido por Ashktorab e Cohen (1992), com as adaptações necessárias ao fitopatógeno em estudo.

O pó de micélio fúngico foi colocado em um Becker no qual foi adicionado 1mL de tampão de extração (8.1.4) e 50 µg/mL de proteinase K. O material foi incubado em banho-de-água a 64° C por 60 minutos. Durante esse período, a mistura foi homogeneizada a cada 15 minutos e após centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, transferido para tubos de centrífuga limpos. O procedimento para purificação do DNA foi repetido duas vezes com um volume de fenol tamponado (8.1.6) para cada volume de sobrenadante para desnaturar e eliminar proteínas. Os tubos foram então gentilmente invertidos para homogeneizar as duas fases, sendo novamente centrifugados a 5000 rpm, por 20 minutos. A fase aquosa foi coletada, transferida para tubos limpos e o procedimento de purificação repetido três vezes com fenol/clorofórmio, na proporção de ½ volume de cada um para cada volume de sobrenadante. Na etapa seguinte foi adicionado um volume de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1 v/v) para cada volume do sobrenadante, submetendo-se novamente a centrifugação. A fase aquosa resultante da última centrifugação foi coletada, acrescentando-se à ela 50 µg/mL de RNase I pancreática (Sigma) e incubada a 37°C por 20 min. Para precipitação do DNA purificado foi adicionado 0,1 volume de acetato de sódio 3M e 2,5 volumes de álcool isopropílico resfriado a -20°C. O DNA precipitado foi coletado com um bastão de vidro, transferido para um tubo falcon, lavado com etanol 70% e centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos. Depois de seco a temperatura ambiente, o DNA foi ressuspendido em água destilada, deionizada e estocado a - 20°C.

3.6 Quantificação do DNA

Para calcular a concentração do DNA genômico foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%. Foi utilizado como padrão de tamanho molecular fragmentos de DNA de fago Lambda clivado com endonucleases de restrição *Hind* III/*Eco* RI numa concentração de 100 ng/ μ L. A quantificação foi feita comparando-se visualmente a intensidade dos fragmentos de λ *Hind* III/*Eco* RI de concentração conhecida com os DNAs de concentrações desconhecidas. Para auxiliar na migração dos DNAs genômicos, foi adicionado tampão de amostra (8.1.10) a cada sistema, permitindo desta maneira a visualização da migração dos DNAs no gel de agarose. A migração dos fragmentos foi realizada em uma cuba de eletroforese, com tampão 1X TAE (8.1.8) com uma corrente de 50mA, por aproximadamente meia hora.

3.7 Amplificação das regiões ITS (PCR-ITS)

Para esse propósito foi utilizado o DNA genômico de todos os isolados. Para realização da PCR-ITS foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores ITS3 e ITS 5 (senso) e os oligonucleotídeos ITS2 e ITS4 (anti-senso) (tabela 3). A amplificação da região ITS1 foi feita utilizando o conjunto de oligonucleotídeos ITS5-ITS2 e a região ITS2 foi amplificada pelo conjunto ITS3-ITS4 (figura 1). Foram testadas diferentes concentrações de

oligonucleotídeos iniciadores, cloreto de magnésio e BSA, levando-se em consideração trabalhos que utilizaram a técnica de PCR-ITS no estudo de fungos (Shi et al., 1995; Pryor & Michailides, 2001; Le Cam et al., 2001).

TABELA 3. Seqüência dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação das regiões ITS1 e ITS2.

Oligonucleotídeo iniciador	Seqüência de bases (5'-3')
ITS2	5' GCTGCGTTCTTCATCGATGC 3'
ITS3	5' GCATCGATGAAGAACGCAGC 3'
ITS4	5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3'
ITS5	5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG 3'

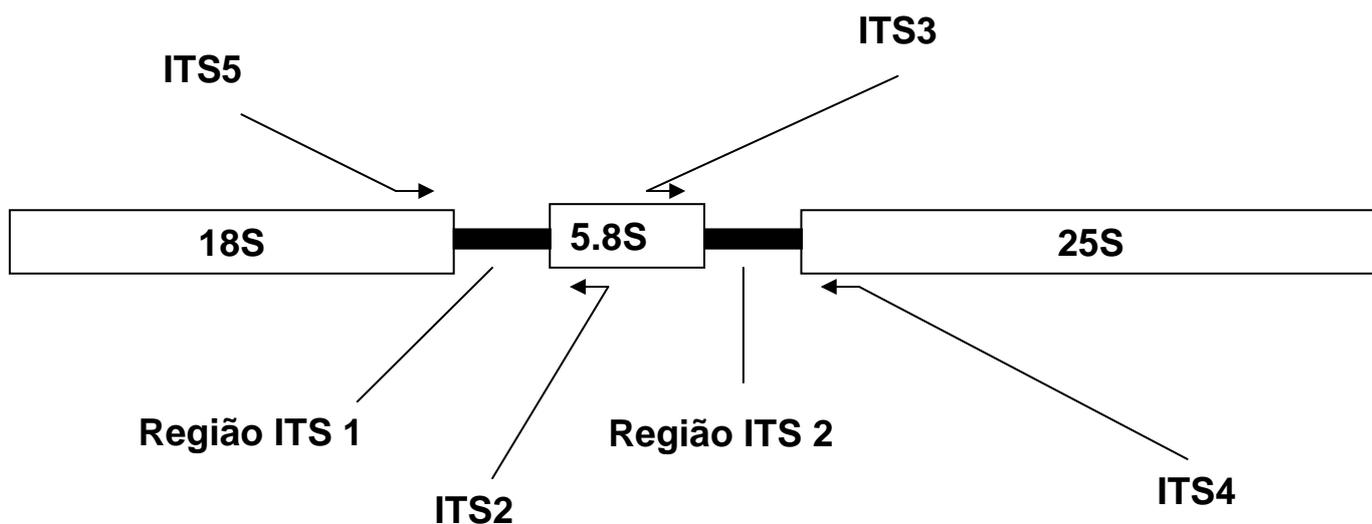


FIGURA 1. Região do rDNA com as regiões ITS1 e ITS2. As setas indicam as regiões de anelamento de cada oligonucleotídeo iniciador.

As reações de amplificação, foram baseadas na técnica de PCR (Mullin & Faloon, 1987). As reações foram realizadas em um aparelho termociclador da marca Eppendorff com um volume final de 25 μ l por reação (tabela 4).

TABELA 4. Reagentes utilizados em PCR-ITS

Reagente	Concentração
DNA	30ng
Oligonucleotídeo iniciador senso	0,1 μ M
Oligonucleotídeo iniciador anti-senso	0,1 μ M
Taq DNA polimerase (Cenbiot)	1U
Tampão Taq DNA polimerase 10X (Cenbiot)	2,5 μ l
Cloreto de Magnésio 50mM	2,5mM
dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)	2,5mM de cada
BSA (soro albumina bovina)	150ng
Água destilada deionizada estéril	completar o volume para 25 μ l
Óleo mineral	1 gota

Foram utilizados dois programas de amplificação, um para cada conjunto de oligonucleotídeos iniciadores. As temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores foram estabelecidas após realizar testes de

amplificação, partindo-se de temperaturas recomendadas por White & Bruns (1990) até a obtenção da melhor temperatura para amplificação das regiões ITS dos isolados em estudo. Para a amplificação do conjunto de oligonucleotídeos iniciadores ITS5 e ITS2 foi empregado: um primeiro ciclo de 2 min a 95°C; seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 60°C e 2 min a 72°C. Para o conjunto ITS3 e ITS4: um ciclo inicial de 95°C por 2 min; seguido de 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 64°C e 2 min a 72°C. Um ciclo de extensão de 72°C por 10 min foi adicionado ao final de cada programa.

3.8 Clivagem com endonucleases de restrição dos produtos de amplificação

A digestão dos produtos amplificados foi feita com 17 endonucleases de restrição que reconhecem de 4 a 6 pares de bases e uma que reconhece 11 pares de bases no fragmento de DNA (tabela 5). As endonucleases utilizadas estão na tabela 5. O sistema foi preparado conforme indicação do fabricante para cada enzima e incubado em banho de água. A presença de polimorfismo foi identificada pela presença quando um fragmento esteve presente em um isolado, mas ausente em outros.

TABELA 5. Sítios de clivagem reconhecidos pelas 18 endonucleases de restrição testadas

Endonuclease	Sítio de clivagem	Endonuclease	Sítio de clivagem
<i>Hae</i> III	5' GG↓CC 3' 3' CC↑GG 5'	<i>Sal</i> I	5' G↓TCGAC 3' 3' CAGCT↑G 5'
<i>Hind</i> III	5' A↓AGCT T 3' 3' T TCGA↑A 5'	<i>Xho</i> I	5' C↓TCGG 3' 5' GAGC↑C 3'
<i>Hinf</i> I	5' G↓ANTC 3' 3' CTNA↑G 5'	<i>Sma</i> I	5' CCC↓GGG 3' 3' GGG↑CCC 5'
<i>EcoR</i> I	5' G↓AATTC 3' 3'...CTTAA↑G...5'	<i>Pvu</i> I	5' CGAT↓CG 3' 3' GC↑TAGC 5'
<i>Bam</i> HI	5' G↓GATCC 3' 3' CCTAG↑G 5'	<i>Hha</i> I	5' G CG↓ C 3' 3' C↑GC G 5'
<i>Pst</i> I	5' C TGCA↓G 3' 3' G↑ACGT C 5'	<i>Msp</i> I	5' C↓CG G 3' 3' G GC↑C 5'
<i>Cla</i> I	5' AT↓CGAT 3' 3' TAGC↑TA 5'	<i>Alu</i> I	5' AG↓CT 3' 3' TC↑GA 5'
<i>Rsa</i> I	5' GT↓AC 3' 3' CA↑TG 5'	<i>Taq</i> I	5'T↓CGA 3' 3' AGC↑T 5'
<i>Bcl</i> I	5' T↓GATCA 3' 3' ACTAG↑T 5'	<i>Bgl</i> II	5' GCCNNNN↓NGGC 3' 3' CGGN↑NNNNCCG 5'

N= qualquer nucleotídeo

3.9 Eletroforese dos produtos da clivagem de fragmentos das regiões ITS

Os produtos de PCR e RFLP-PCR das regiões ITS foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 8% não desnaturante em uma corrente elétrica de 50mA por 2h e submetidos a luz ultravioleta para serem fotografados com câmara digital Kodak DC 120, através do programa Kodak 1D (versão 3.5.2).

3.10 Cálculo do peso molecular dos fragmentos amplificados e produtos de clivagem

O peso molecular dos fragmentos obtidos com a amplificação das regiões ITS clivados com endonucleases de restrição foram estimados medindo-se a distância de migração de cada fragmento. Como padrão foi utilizado o marcador Lambda digerido com a endonuclease de restrição *Pst* I ou *Eco* R I / *Hind* III / *Cla* I.

Os valores das distâncias dos fragmentos foram aplicados à fórmula:

$\text{Log } y = \text{log } A + \text{Log } B \cdot \text{Log } X$ onde:

X = distância de migração dos fragmentos

Y = peso molecular dos fragmentos

A = Constante de regressão

B = Coeficiente de regressão

3.11. Análise estatística

A partir da análise dos perfis dos fragmentos de DNA dos isolados foi construída uma matriz de similaridade com o programa SPSS (versão 10.1), onde foram considerados os valores 1 e 0 para presença e ausência de um dado fragmento respectivamente. Foi utilizado o coeficiente de similaridade de DICE (Sorensen ou Czekanowski), o qual atribui grande importância à concordância positiva e desconsidera a ausência de similaridade, sendo mais apropriado para comparação de diferentes espécies.

A análise dos grupamentos para construção dos dendrogramas foi feita pelo método do vizinho mais distante (*furthest neighbour clustering*), que opera com o par mais distante de itens, utilizando o programa SPSS versão 10.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentração de oligonucleotídeos iniciadores, BSA e cloreto de magnésio

Foram testadas concentrações de oligonucleotídeos iniciadores: 0,3 μM , 0,25 μM , 0,15 μM e 0,1 μM , por reação, até determinar a quantidade ideal para obter um padrão de fragmentos de DNA com intensidade e reproduzível. Embora não tenham sido testadas concentrações menores que 0,1 μM , esta concentração foi escolhida por ser a que manteve essas características. Foram testadas diferentes concentrações de cloreto de magnésio (3,5 mM, 3 mM, 2,5 mM, 2 mM), que atua como cofator da enzima *Taq* DNA polimerase e auxilia a dissolver melhor os dNTPs na mistura de reagentes, sendo selecionada a concentração de 2,5 mM. Foram testadas diferentes concentrações de BSA (50 ng, 100 ng e 150 ng), que serve para manter a estabilidade da enzima *Taq* DNA polimerase e dos oligonucleotídeos iniciadores, sendo escolhida a concentração de 150 ng.

4.2 Produtos de PCR das regiões ITS1 e ITS2

A eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, dos fragmentos de DNA amplificados com os oligonucleotídeos universais da região ITS1 e ITS2 do DNA de isolados dos fungos fitopatogênicos *B. sorokiniana* e *B. oryzae*, *D. teres*, revelou a presença de dois fragmentos para ambas as regiões, um menor e com menos concentração de DNA e outro maior e com maior concentração de DNA. Os tamanhos dos fragmentos foram estimados em: 240pb e 258pb (ITS1) e 354pb e 428pb (ITS2) (figura 2). O padrão de fragmentos de PCR-ITS foram os mesmos para essas três espécies analisadas.

Polimorfismos na região ITS tem sido reportado em plantas, nematodos (Aanen et al., 2001), afídeos (Insecta) (Fenton et al, 1998), carrapatos (*Ixodes ssp*)(Mclain et al, 1995). Também tem sido relatada a ocorrência de polimorfismos intragenômicos na região codificante 18S do rDNA em Platelintos (*Dugesia mediterranea*), e Protista (*Plasmodium sp*) (Carranza et al, 1996). Versões divergentes de ITS em fungos foram observadas em zigomicetes, basidiomicetes e ascomicetes. Hosny et al. (1999) encontraram no fungo endomicorriza *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes) duas seqüências diferentes de ITS no mesmo isolado, utilizando oligonucleotídeos universais, uma com 541 pb e outra com 461 pb. O'Donnell & Cigelnik (1997) estudando *Fusarium spp.* descobriram a existência de dois tipos intragenômicos diferentes de ITS2, em todas as linhagens testadas, um maior (tipo I) em elevado número de cópias e outro menor (tipo II) em baixo número de cópias. Ko et al. (2002), trabalhando com seqüenciamento da região

ITS, verificaram a presença de duas versões de ITS1 em linhagens de *Trichaptum abietinum* (Basidiomycetes), tipo I (444pb), tipo II(249-251pb). Foi verificado também que três linhagens de *T. abietinum* provenientes da Coreia apresentaram uma terceira versão adicional designada como tipo III (490-491pb).

Neste trabalho os isolados de *B. sorokiniana*, *D. teres* e o isolado de *B. oryzae* apresentaram também duas versões de ITS1 e ITS2, sendo que os isolados 98023(PR) e 98032(PR) apresentaram uma terceira versão adicional de ITS1 de aproximadamente 225 pb (figura 2A). Como os 2 isolados são da mesma região geográfica isso poderia sugerir a formação de uma nova versão endêmica de ITS1, tal como ocorrido com *T. abietinum* da Coreia (Ko et al.,2002), no entanto, os outros isolados do Paraná não apresentam essa terceira versão de ITS1, portanto não se trata de um endemismo. Da mesma forma no estudo com *T. abietinum* deveriam testar um maior número de isolados para confirmar se a terceira versão ITS1 que eles encontraram é realmente endêmica da Coreia, uma vez que foram analisados somente 3 isolados, ou ainda se somente alguns isolados desta região apresentam essa terceira versão de ITS.

Uma questão importante é se as diferentes versões de ITS estão em núcleos diferentes ou se elas coexistem no mesmo núcleo, uma vez que a migração de núcleos diferentes de uma hifa para outra leva a condição de heterocariose e algumas vezes à ocorrência do ciclo parassexual, atribuído como sendo a principal fonte geradora de variabilidade genética em fungos com estágio sexual ausente como é o caso das três espécies analisadas nesse

estudo (Müller, 2000). A presença de setores, zonas com textura e cor diferentes do restante da colônia, marcam a presença de diferentes tipos de núcleos e a preponderância de um deles na colônia fúngica (Jennings & Lysek, 1999). Esse fenômeno tem sido bastante relatado em certas espécies de fungos inclusive em *B. sorokiniana* (Valim-Libres et al., 1996; Oliveira et al., 1998 e Müller, 2000). Santos (1996) também observou a presença de setores em colônias de isolados de *D. tritici-repentis*. Um estudo, utilizando culturas resultantes da germinação de um único conídio de *B. sorokiniana*, poderia ser realizado para verificar se as diferentes versões de ITS encontram-se em núcleos diferentes ou no mesmo núcleo, pois a colônia monospórica poderia ser resultante da germinação de uma única célula do esporo, contendo um único núcleo. Em *Hebeloma velutipes* (basidiomicete) duas diferentes versões de ITS1 e ITS2 foram encontradas residindo em núcleos diferentes do dicário, uma vez que monocárions apresentaram somente uma das versões de ITS (Aanen et al., 2000).

O DNA ribossomal é referido como tendo uma reduzida variação intra-específica em comparação à variação interespecífica, devido ao processo de evolução concertada, em que ocorre “crossing over” entre as repetições do rDNA no mesmo cromossomo ou em homólogos, levando homogeneização por conversão gênica (Carranza et al., 1996; O’Donnell et al., 1998) . No entanto, os resultados desse trabalho e aqueles realizados pelos autores referidos anteriormente revelam a ocorrência de evolução não-concertada. Por outro lado, ambos os tipos de ITS podem ter escapado da homogeneização

por conversão gênica por estarem localizados em cromossomos diferentes (não homólogos).

A hipótese de especiação via hibridização interespecífica pode auxiliar no entendimento da ocorrência de versões divergentes de ITS em *B. sorokiniana*, *B. oryzae* e *D. teres*. Se, durante a evolução dessas três espécies, o processo de especiação ocorreu via hibridização entre espécies ancestrais, que não desenvolveram barreiras reprodutivas e compartilhavam o mesmo nicho, a espécie híbrida carregaria ambas as versões de ITS das linhagens parentais. O'Donnell & Cigelnik (1997) utilizaram a hipótese da especiação via hibridização para explicar a ocorrência de divergentes tipos ITS2 em *Fusarium spp*. Uma hipótese alternativa sugere que variação pode ser resultante de duplicação genética seguida pela divergência de uma das cópias, que pode ser preservada como tampão contra mutações deletérias. Por outro lado, também pode estar ocorrendo fluxo gênico entre diferentes espécies que compartilham o mesmo nicho. *B. sorokiniana* pode ser encontrado em arroz, embora não seja patógeno deste. *B. sorokiniana* também compartilha o mesmo nicho com *D. teres* e com *D. tritici-repentis*.

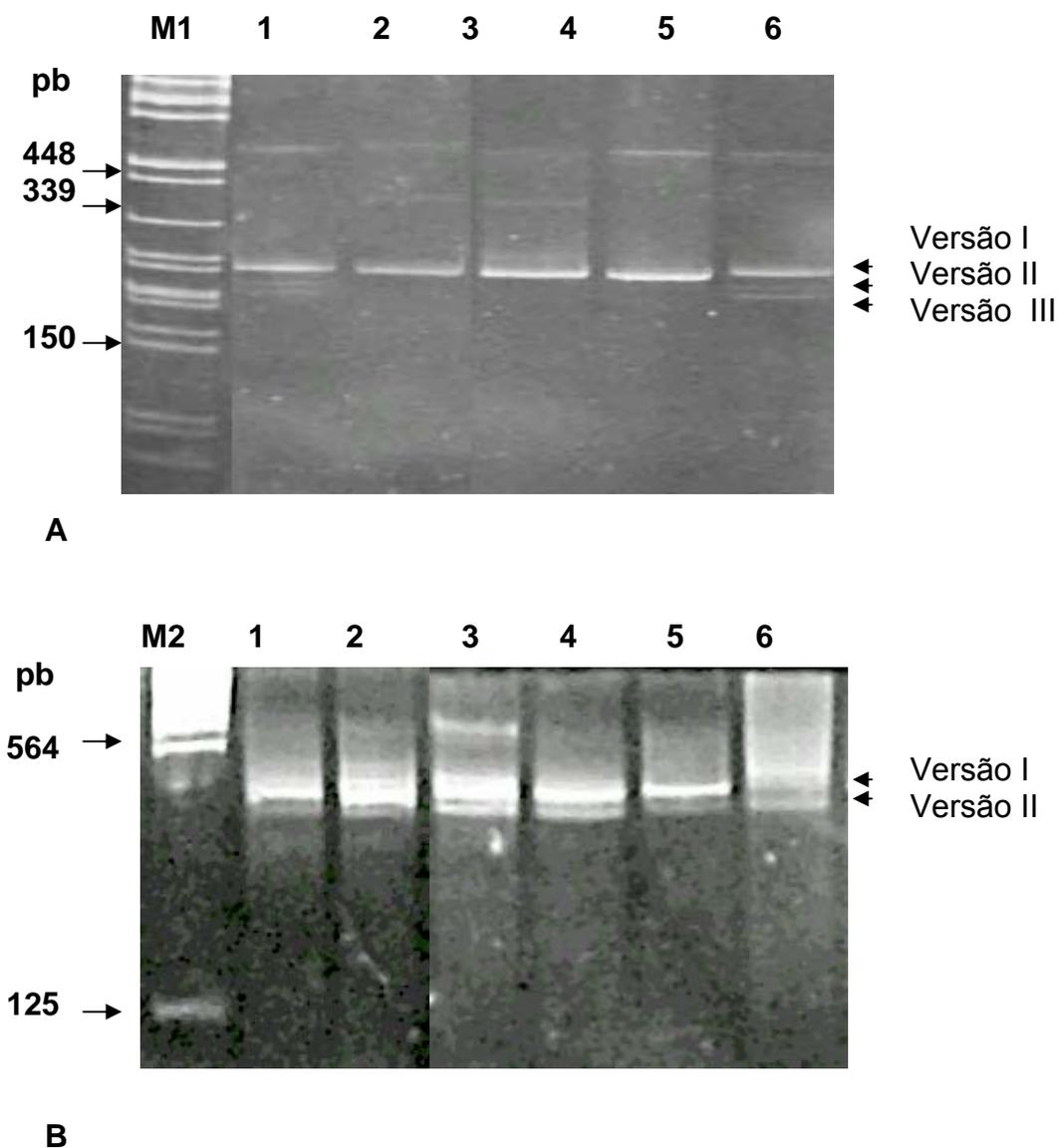


FIGURA 2: Análise de PCR dos fragmentos de DNA das regiões ITS1 e ITS2 dos isolados em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo. **(A)** Perfil dos fragmentos não digeridos da região ITS1. **(B)** Perfil dos fragmentos não digeridos da região ITS2. (M1), marcador de tamanho λ -*Pst* I; (M2), marcador molecular λ -*Hind* III-*EcoR* I; (1), BO2002; (2), D3; (4), 98023; (5), CV48; (6), 98032.

4.3 Análise da região ITS1 com endonucleases de restrição

Das 18 endonucleases de restrição testadas apenas três apresentaram sítios de clivagem na região ITS1 (*Hae* III, *Hha*I e *Hinf* I) (8.2.1).

A endonuclease *Hinf* I gerou com o DNA do isolado 98041 de *B. sorokiniana* três fragmentos designados de C1 até C3 (tabela 6). Para os demais isolados de *B. sorokiniana* e para os isolados de *D. teres* e *B. oryzae* não houve clivagem dos fragmentos de DNA com essa enzima. A ocorrência de duas versões de ITS dificultou estimar de qual delas os fragmentos de clivagem originaram.

O número de fragmentos encontrado com a endonuclease de restrição *Hae* III foi de 5, sendo numerados de A1 até A5 conforme o tamanho de pares de bases (tabela 5). Os fragmentos de DNA da região ITS1 dos isolados Dt2, Dt4 e Dt5, de *D. teres*, não apresentaram sítios de clivagem para esta endonuclease de restrição. O isolado BS9 apresentou somente o fragmento A5. 32 isolados apresentaram o perfil de fragmentos A1 e A4. Os isolados CM01-05, 1972, 1978, BS6M1, 98043, 98023, 98022 e 98021 apresentaram o perfil de fragmentos A1 e A5. Os isolados 1965 e CV48 apresentaram o perfil de fragmentos A2, A4 e A5. O perfil de fragmentos A1 e A3 foi encontrado nos isolados B02002 e Dt3; A1 e A2 no isolado 98030; A3, A4 e A5 no isolado 98031; A1, A2 e A5 no isolado 91; A1, A4 e A5 no isolado NRRL5851; A2 e A4 no isolado CV13; A4 e A5 no isolado Dt1; A1, A2 e A4 nos isolados 98010 e 98011 e o perfil de fragmentos A1, A3 e A4 no isolado Dt6.

Todos os 57 isolados apresentaram sítios de clivagem na região ITS1 com a endonuclease de restrição *Hha* I. Foram gerados 7 fragmentos de DNA de tamanhos diferentes, numerados de B1 até B7 (tabela 6). Cada isolado apresentou de 2 até 4 fragmentos. O fragmento B4 esteve presente em 55 isolados, sendo que os isolados NRRL5851 e CM01-05 foram os únicos que não apresentaram este fragmento. O fragmento B2 foi encontrado nos isolados 9010, 98030, BS16M1, 1972, CV48, Dt4 e Dt5. O isolado NRRL5851 foi o único que apresentou o fragmento B7. O isolado CV48 foi o único a apresentar o fragmento B1. O fragmento B6 foi encontrado nos isolados Dt3, CM01-05 e 98031. O fragmento B3 foi encontrado em 36 isolados e o B4 em 18 isolados. (FIGURA 3).

TABELA 6. Padrões de fragmentos da clivagem da região ITS1 com as endonucleases de restrição *Hinf* I, *Hae* III e *Hha* I.

Endonuclease de restrição	<i>Hinf</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I
Tamanho do fragmento (pares de bases)	104 (C1), 133 (C2), 224 (C3)	130 (A1), 157 (A2), 186(A3), 207 (A4), 228 (A5)	53 (B1), 77 (B2), 109 (B3), 143 (B4), 164 (B5), 177 (B6), 199 (B7)

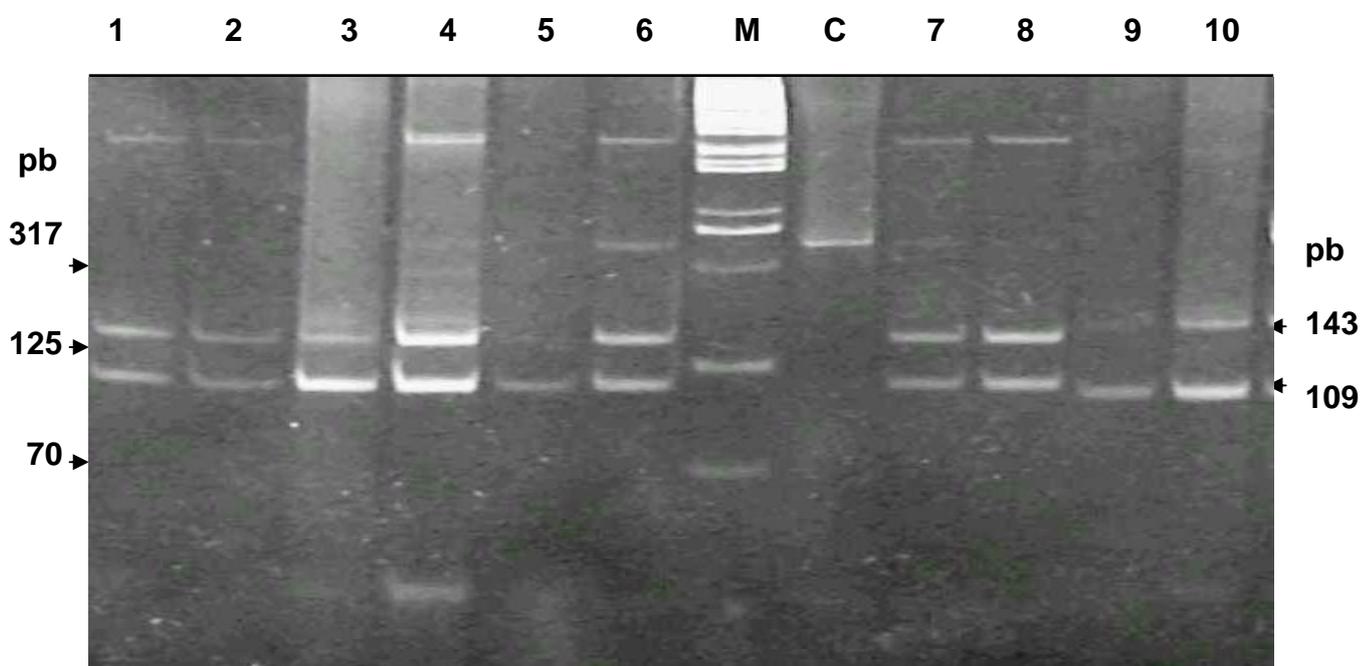


FIGURA 3: Perfil dos fragmentos de DNA de ARDRA-ITS1 com a endonuclease de restrição *Hha* I dos isolados, em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo. (M), marcador tamanho λ /*Hind* III/*EcoR* I/ *Cla* I ; (C), fragmento não digerido da região ITS1; (1), 98028; (2), 98021; (3), 98043; (4), 98019; (5), 98032; (6), 98033; (7), 98042; (8), CV13; (9), D1; (10), D2.

4. 4 Análise da região ITS2 com endonucleases de restrição

Das 18 endonucleases de restrição 9 apresentaram sítios de clivagem na região ITS2: *Hae* III , *Hha* I, *Taq* I, *Alu* I, *Hind* III, *Hinf* I, *EcoR* I, *Rsa* I e *Msp* I . Sete das 9 enzimas foram utilizadas nesse estudo. Os padrões

de fragmentos obtidos com as endonucleases de restrição estão na tabela 7 (Figuras 4 e 5).

A endonuclease de restrição *Hae* III gerou 9 fragmentos designados a1 até a9 (Tabela 7). Os isolados apresentaram de 2 a 4 fragmentos. O fragmento a7 foi encontrado somente nos isolados 98022, CV48 e 1992. O fragmento a9 ocorreu apenas no isolado 98017. Os isolados 98010, 98012, 98026 e 98030 apresentaram o perfil de fragmentos a4, a6 e a8. O fragmento a2 foi encontrado nos isolados CS12-13, 1978, 104, 98022 e 98033. Os fragmentos a1, a4 e a6 foram encontrados nos isolados 98033 e NRRL5851. O perfil de fragmentos a3, a4 e a6 foi observado nos isolados Dt2, Dt4, Dt5, Dt6 e 98019 e o perfil a5 e a6 nos isolados Dt3, B02002, 98006, 98011, 98013, 98018, 98025, 98029, 98040, 98042, 98043, BS9 e 0892. O perfil de fragmentos a4 e a6 esteve presente nos isolados Dt1, 98021, 98031, 1792, BS6M1, 91 e CS10-04. Os isolados 98004, BS18M2, BS52M1, CF02-01 e B2 apresentaram o perfil de fragmentos a3, a5 e a6. Os fragmentos a1, a4, a5 e a8 ocorreram nos isolados 98033, CS12-13, 1978 e 1972. O perfil de fragmentos a1, a3, a5 e a7 ocorreu no isolado 98022 e o perfil a1, a5, a6 e a8 ocorreu no isolado 98028.

A endonuclease de restrição *Hha* I gerou 7 fragmentos designados b1 a b7 (Tabela 8). O número de fragmentos por isolado variou de 2 a 5. Os fragmentos b1 e b3 foram encontrados em 42 isolados. O fragmento b7 foi encontrado nos isolados 98032, 0892, 1792, 104 e NRRL5851. O perfil de fragmentos b1, b4, b5 e b6 foi encontrado nos isolados Dt1, Dt2, Dt3, 98026 e 98006 e o perfil b1, b2, b3, b4 e b5 nos isolados B02002 e 98029. Os

fragmentos b1, b3 e b4 ocorram nos isolados 98011, 98021, 98022, 98041, 98043, BS52M1, Cf02-01, A20, CS12-13, 1978, CV13, CV48 e Dt6. O perfil de fragmentos b1, b3, b5 e b6 foi observado nos isolados 98007, 98012, 98017, 98018 e 98019 e o perfil b1, b3, b4, b5, e b6 nos isolados 98014, 98025, BS6M1, CS10-04 e CM01-05. O perfil de fragmentos b1, b2, b3, b5, b7 ocorreu no isolado 98004; b3, b5, b6 e b7 no isolado 98010, o b1, b2, b3 e b4 no isolado 1992, b1, b3, b4 e b6 no isolado 98028, o perfil b1, b2, b3, b4 e b5 no isolado 98029, o perfil b2 e b4 no isolado 98031, o perfil b1, b3, b4, e b7 no isolado 98032. O perfil b1, b2, b3, b4 e b7 foi observado no isolado 98040, o b5 e b6 no isolado 98042 o perfil b3, b4, b5, b6 e b7 no isolado 0892, o b1, b2, b3, b4 e b7 no isolado 1792, o perfil b1, b2, b3 e b6 no isolado BS9, o b1, b3, b4 e b5 no isolado BS18M2, o perfil b1, b3, b4 e b7 no isolado 104, o b3, b4 e b5 no isolado 1965; b4 e b6 no isolado CS11-10; b1, b3, b5 e b6 no isolado 1972; b1, b3 e b4 no isolado Dt4. O perfil de fragmentos b1, b3 e b5 foi encontrado nos isolados 98003, 98013, 98023, 98030 e BS16M1 e o perfil b2 e b4 nos isolados 98033, 91,B2 e Dt5.

A endonuclease *Hinf* I gerou 10 fragmentos designados c1 a c10. Os fragmentos mais freqüentemente encontrados foram o c2 e o c4 em 43 e 53 isolados, respectivamente, sendo que os isolados 98042, BS9, 104, CS12-13 e Dt1 apresentaram somente estes 2 fragmentos. O maior número de fragmentos foi encontrado no isolado CF02-01 com oito fragmentos (c1, c3, c4, c5, c6, c7, c9 e c10), sendo seguido pelo isolado 98030 com sete fragmentos (c1, c2, c3, c4, c5, c6 e c7). O perfil de fragmentos c1, c2, c3, c4 e c7 foi encontrado nos isolados 98011, 98013, 98029, BS6M1, 1972 e CV13, o c1, c2, c4 e c7 nos

isolados 1992, 98040, 0892 e 1965, o perfil c2, c4 e c5 nos isolados 98007, 98019, 98031, 98033, BS16M1, 1978, CM01-05 e Dt5, o c2, c4 e c7 nos isolados 98021, 98043, 1792, CS11-10 e CS10-04, o c2 e c4 nos isolados 98042, BS9, 104, A20, CS12-13 e Dt1, o perfil c1, c3, c4, c5 e c6 nos isolados 98032 e CV48; c3, c5 e c6 nos isolados 98010 e 98023, o c3, c4, c5 e c6 nos isolados 98003 e 98041. O perfil de fragmentos c2, c4, c5 e c7 foi observado no isolado 98004, o c1, c2, c3, c4 e c5 no isolado 98006, o padrão c3, c4, c6 e c7 no isolado 98012, o c1, c2, c4, c5 e c7 no isolado 98014; c1, c2 e c4 no isolado 98017, o c4 e c5 no isolado 98018. O padrão de fragmentos c1, c2, c4 e c5 foi observado no isolado 98022, o c1, c2, c4, c8 e c10 no isolado 98025 e o c1, c3 e c4 no isolado 98026. Os padrões de fragmentos c3, c4, c5 e c6, c2, c3, c5 e c10 e c2, c4, c5, c6 e c7 foram observados nos isolados 98028, BS18M2 e BS52M1, respectivamente. Os perfis de fragmentos c2, c4 e c8, c1, c2, c3, c4, c5 e c6 e c1, c3, c5 e c9 foram encontrados nos isolados BO2002, Dt2, Dt3, Dt4 e Dt6, respectivamente.

Nove fragmentos foram gerados pela endonuclease de restrição *Hind* III, designados de d1 a d9. O fragmento de DNA da região ITS2 do isolado 98030 não apresentou sítios de clivagem para esta enzima. O maior número de fragmentos ocorreu no isolado BS16M1 com 6 fragmentos (d3, d4, d5, d7, d8 e d9). O perfil de fragmentos d1 e d5 foi encontrado no isolado 9807; d2 e d7 nos isolados 98018, BS6M1, BS18M2, BS52M1, CS11-10, CM01-05 e CV48; d1 e d6 nos isolados 98022, A20 e NRRL5851; d3 e d8 nos isolados Dt1 e Dt6; d3 e d7 no isolado Dt2. Os fragmentos mais freqüentes foram d5 e d2, encontrados em 29 e 31 isolados, respectivamente. O perfil de fragmentos

d2, d5 e d7 foi encontrado nos isolados 98003, 98006, 98019, 98026, 98028, 98029, 98031, 1965, CS12-13, CS10-04, CV13 e B02002. O padrão de fragmentos d3, d4, d5, d7 e d8 foi observado nos isolados 98004 e 98014, o d2, d8 e d9 nos isolados 98011 e 98025, o d1, d3 e d5 nos isolados 98032, 98041, 98042 e 98043, o d1, d6 e d8 nos isolados 98010 e 98012. Os padrões de fragmentos d1, d5, d7 e d9 ; d2, d5, d7 e d9; d2, d4 e d7; d2 e d8; d1, d4 e d8 foram observados somente nos isolados 98013, 98017, 1992, 98021 e 98023 respectivamente. O mesmo resultado foi observado para os perfis d2, d5 e d9; d2, d4, d6 e d7; d3, d4, d5, d7, d8 e d9; d3, d5 e d8; d2, d8 e d9; d5, d7 e d9; d2, d5 e d8; d3, d5, d7 e d8 e o d2, d5, d7 nos isolados 98040, BS9, BS16M1, CF02-01, 104, 91, B2, 1978 e Dt4 respectivamente.

A endonuclease *Rsa I* gerou 13 fragmentos designados e1 a e13. Os isolados apresentaram de 2 a 8 fragmentos. Os fragmentos com maior frequência foram o e4 encontrado em 40 isolados e o e5 encontrado em 30 isolados. Os fragmentos e4 e e5 foram encontrados em 23 dos isolados. O isolado 1965 apresentou um fragmento (e6). O perfil de fragmento e3, e4, e5, e8 e e10 foi encontrado nos isolados 98003, 98004, 98014, 98019, 91, CV48 e Dt6; e4, e5, e7, e9 e e10 nos isolados 98007, 98026 e BS9; e5, e10 e e11 nos isolados 98011, 98025 e Dt4; e4, e5, e6, e7 e e9 nos isolados 98012, 98022, 98023, 98030 e 98041; e4 e e11 nos isolados 1992 e 0892; e4, e5 e e8 nos isolados 98013, 98029, 98042 e B2. O padrão de fragmentos e1, e4, e8 e e11 foi observado nos isolados 98017 e 98040; e5 e e11 nos isolados 98018, CS11-10, 1978 e Dt1. Os perfis de fragmentos e4, e8, e e10; e4, e8 e e11; e4, e6 e e10; e2, e4, e10 e e11; e7 e13; e4, e10 e e12 foram observados nos

isolados 98006, 98028, 98032, 1792, BS52M1 e NRRL5851 respectivamente. Os isolados BO2002, 104, CF02-01 apresentaram os perfis de fragmentos e6 e e10; e4 e e10; e6 e e12 respectivamente. Os isolados Dt4, 98033 e 98031 apresentaram os fragmentos e2, e3, e4 e e8; e2, e3,e4 e e5; e5, e9, e10 e e13 respectivamente. Os isolados 98010 e 98021 foram observados com os padrões e4, e5, e6, e7, e9 e e10; e3, e4, e5,e6, e8,e9, e10 e e11 respectivamente.

O número de fragmentos gerados pela endonuclease de restrição *Msp* I foi 8, designados f1 a f8. Quarenta e nove isolados tiveram o fragmento f4 e 39 o fragmento f6, sendo que 38 isolados apresentaram os dois fragmentos. O perfil de fragmentos f4 e f7 ocorreu nos isolados 98007, 98012, 98017, 98019, 98023, 98028, 98030 e 98031; f1, f2, f5, f7 e f8 nos isolados 98003, 98004, 98014, 98029,98033, CM01-05 e BS16M1; f2, f4, f6 e f7 nos isolados 98006 e BS6M1; f4, f6 e f7 nos isolados 98010, 98013, 98026, 1978, CV48, Dt1, Dt2, Dt3 e Dt5; f4, f6 e f8 nos isolados 98011, 98018, 1992, 98021, 98022, 98025, 98032, 98040, 98043, 0892, 1792,BS9, CF02-01, 91, A20, 1965, CS11-10, 1972, CV13, BO2002 e Dt4; f3, f4, f6 e f7 nos isolados 98041, 98042, 104 e Dt6; f3, f4 e f7 nos isolados BS52M1 e CS12-13; f2, f4,f6 e f7 nos isolados BS18M2, CS10-04 e NRRL5851; f4 e f6 no isolado B2.

A endonuclease *Eco* R I gerou 8 fragmentos designados g1 a g8. O fragmento de DNA da região ITS2 do isolado Dt3 não apresentou sitio de clivagem para esta endonuclease. Os fragmentos com maior frequência foram o g4 e g8. O fragmento g8 foi o único que ocorreu nos isolados 98012, 98021, 98025, BS6M1, 104, CS11-10 e Dt2. O fragmento g6 foi o único encontrado

nos isolados 1792 e BO2002. O perfil de fragmentos g4, g6 e g7 foi observado nos isolados 98003, 98004 e 98028; g3 e g6 nos isolados 98006, 98011, 98019 e Dt1; g4 e g7 nos isolados 98007 e 98014; g4, g6 e g8 nos isolados 98010, 98013, 98030 e 98041; g6 e g8 no isolado 98017; g3 e g5 nos isolados 98018, 98029, 98040, 98042, 0892, BS16M1 e B2; g4 e g8 nos isolados 1992, 98022, 98023, CS10-04 e Dt4; g4 e g5 nos isolados 98026, 98043, BS18M2, BS52M1, 1965 e CS11-10; g4 e g6 no isolado 98031; g3, g5 e g7 no isolado 98032; g1, g2 e g8 nos isolados 98033, CF02-01, 1972 e CM01-05; g1, g2, g3 e g8 no isolado BS16M1; g2, g4 e g7 no isolado 91; g3 e g8 nos isolados A20 e CV13; g3, g5 e g7 no isolado NRRL5851; g2 e g8 no isolado 1978; g2, g4 e g8 no isolado CV48; g2, g4 e g5 no isolado Dt5; g3, g6 e g7 no isolado Dt6.

TABELA 7. Padrões da clivagem da região ITS2 com as endonucleases de restrição *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Hind* III, *Rsa* I, *Msp* I e *Eco* R I.

Endonuclease de restrição	Tamanho dos fragmentos (pb)
<i>Hae</i> III	67 (a1), 87 (a2), 124 (a3), 148 (a4), 170 (a5), 197 (a6), 217 (a7), 239 (a8) e 260 (a9)
<i>Hha</i> I	133 (b1), 153 (b2), 172 (b3), 183 (b4), 200 (b5), 237 (b6) e 255 (b7)
<i>Hinf</i> I	41 (c10), 79 (c2), 91 (c3), 109 (c4), 128 (c5), 142 (6), 158 (c7), 179 (c8), 200 (c9) e 250 (c10)

Cont. da tabela 7

<i>Hind</i> III	130 (d1), 157 (d2), 186 (d3), 207 (d4), 228 (d5), 253 (d6), 266 (d7), 286 (d8) e 319 (d9)
<i>Rsa</i> I	43 (e1), 62 (e2), 95 (e3), 117 (e4), 147 (e5), 162 (e6), 177 (e7), 205 (e8), 220 (e9), 253 (e10), 270 (e11), 292 (e12) e 315 (e13)
<i>Msp</i> I	48 (f1), 65 (f2), 102 (f3), 132 (f4), 147 (f5), 166 (f6), 180 (f7) e 199 (f8)
<i>Eco</i> R I	37 (g1), 59 (g2), 71 (g3), 95 (g4), 289 (g5), 310 (g6), 342 (g7) e 375 (g8)

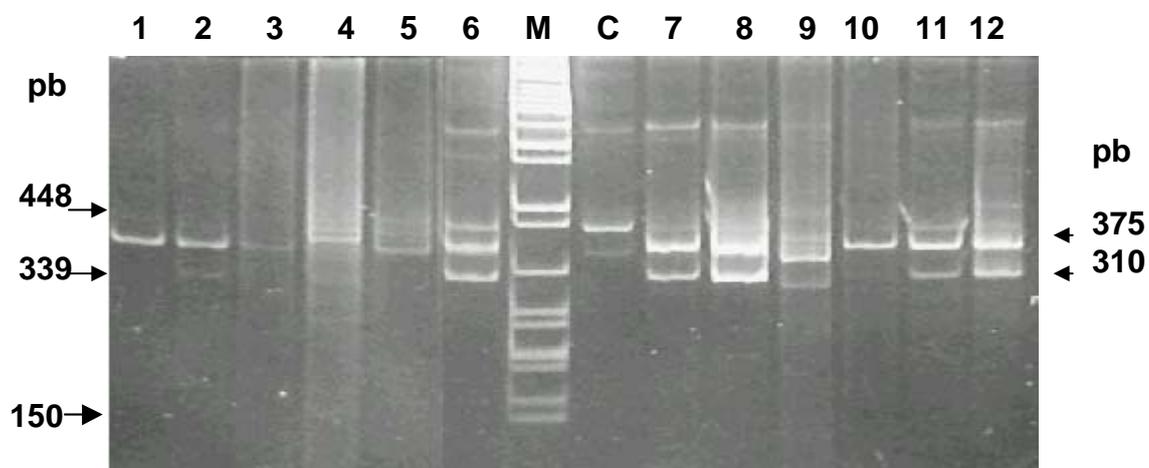


FIGURA 4 : Perfil dos fragmentos de DNA de ARDRA-ITS2 com a endonuclease de restrição *Eco* R I dos isolados em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo. (M), marcador tamanho λ /*Pst* I; (C), fragmento não digerido da região ITS2; (1), CM01-05; (2), 98028; (3), CS11-10; (4), 98012; (5), 1992; (6), 98013; (7), 98010; (8), 98030; (9), 98004; (10), D2 (11), 98017; (12), 98041.

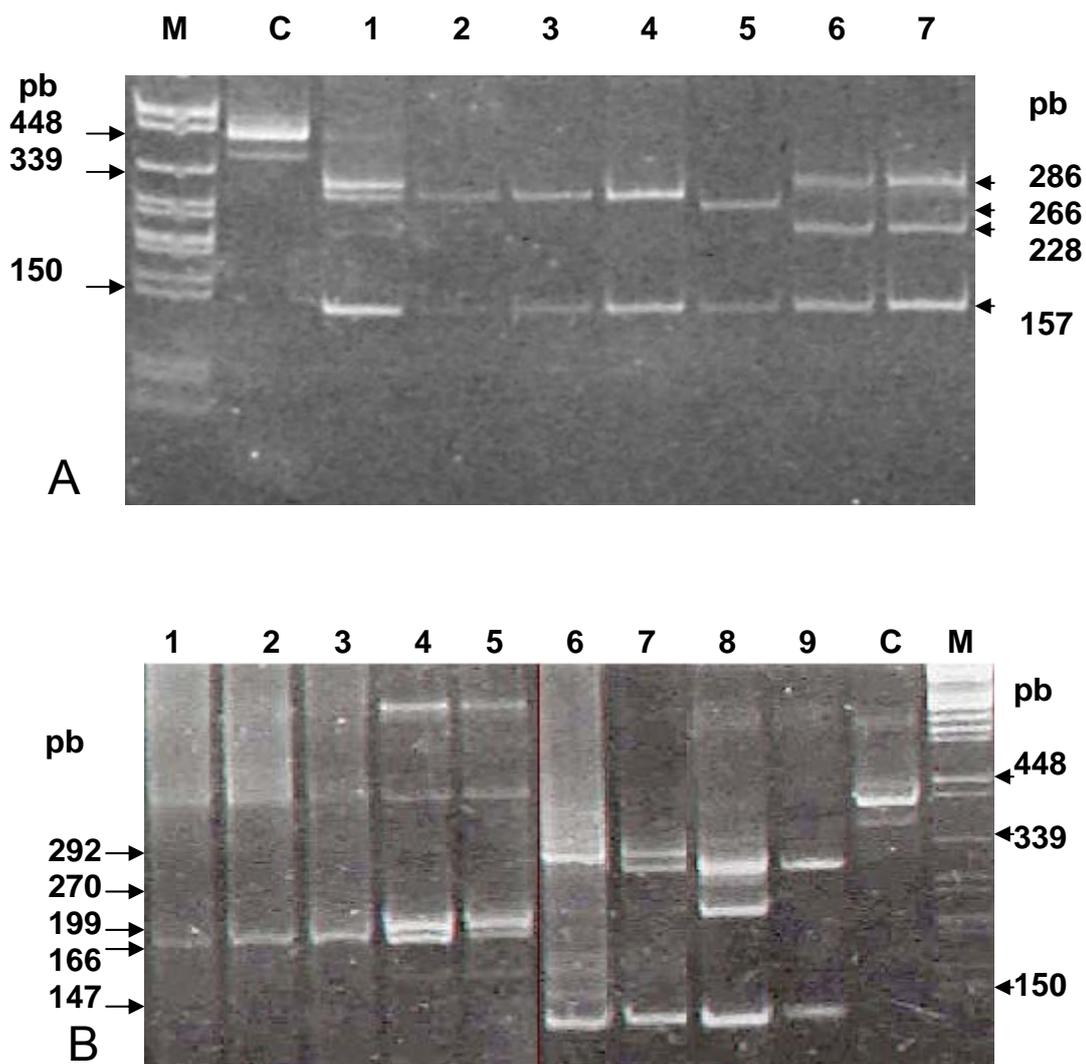


FIGURA 5: Perfil dos fragmentos de DNA de ARDRA-ITS2 dos isolados em gel de poliacrilamida 8% corado com brometo de etídeo. **(A)** Perfil dos fragmentos com a endonuclease de restrição *Hind* III: (1), Dt4; (2), 98018; (3), CS11-10; (4), CV48; (5), NRRL5851; (6), Cf02-01; (7), B2. **(B)** Perfil dos fragmentos com a endonucleases *Msp* I e *Rsa* I. *Msp* I: (1), 98023; (2), 98030; (3), 98031; (4), CS11-10; (5), 91. *Rsa* I: (6), 98018; (7), 98025; (8), Dt2; (9), Dt1. (M), marcador de tamanho λ /*Pst* I ; (C), fragmento não digerido da região ITS2.

4.5 Análise dos dendrogramas de ARDRA-ITS1 dos isolados.

4.5.1 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados de outros países

De acordo com o dendrograma obtido através da análise de 18 isolados de *B. sorokiniana* provenientes da Dinamarca, França, Canada, Bélgica, Turquia, México, Nepal, Vietnã, Bangladesh e África do Sul (figura 6), os índices de similaridade variaram de 25 a 100%. Foram observados 4 grupos com um nível de similaridade >60 % e o isolado 1965 da Dinamarca que ficou sem agrupar-se com esse nível de similaridade. O Grupo 1 foi formado pelos isolados 1978, BS6M1 e CM01-05 . O Grupo 2 agrupou os isolados CS10-04, BS16M1, 104 e CF02-01. O Grupo 3 formou-se com isolados 91, 1972 e BS9. O Grupo 4 reuniu os isolados BS52M1, BS18M2, CS11-10, B2, CS12-13, A20 e NRRL5851. Os Grupos 3 e 4 apresentaram entre si 50% de similaridade unindo-se com o Grupo 2 28,6%. O isolado 1965 ligou-se ao Grupo 1 com 44,4% de similaridade e com os Grupos restantes 25%.

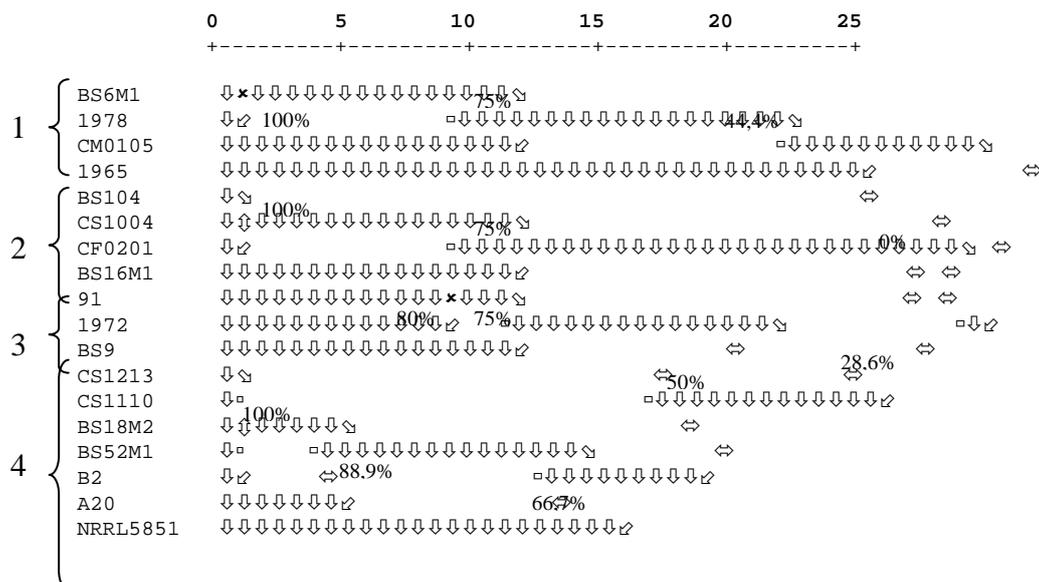


FIGURA 6. Dendrograma ARDRA-ITS1 de isolados de *B. sorokiniana* de outros países. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica a distância Euclidiana.

4.5.2 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil

No dendrograma construído a partir da análise dos isolados do Brasil (Figura 7) os índices de similaridade variaram de 18,2% a 100%. Formaram-se 6 grupos com um nível de similaridade >60%. O Grupo 1 foi formado pelos isolados Dt2, Dt4 e Dt5. O Grupo 2 agrupou os isolados 98029, 98042, 98013, 98023, 98043, 98021, 0892, 1792, 98004, 98040, 98032, 98028, 98019, 98006 e Dt1. O Grupo 3 formou-se com os isolados CV13, CV48), 98011 e 98010. O Grupo 4 foi constituído pelos isolados 98026, 98033, 98003, 98018, 98025, 98014, 98017, 98007, 98012, 98030 e 98022. O Grupo 5 foi formado pelos

isolados Dt6 e BO2002. O Grupo 6 foi constituído pelos isolados 98031 e Dt3. O Grupo 1 reuniu-se com o Grupo 2 com 57,1% de similaridade e estes com o Grupo 3 com 44,4%. O isolado 98041, que não havia agrupado-se, ligou-se ao grupo 5 com 54,5% de similaridade e este ligou-se ao grupo 4 com 36,4%. Os Grupos 4, 5 e o isolado 98041 uniram-se aos Grupos 1, 2 e 3 com 25% de similaridade e estes com o Grupo 6 com 18,2%.

4.5.3 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil e de outros países

O dendrograma (Figura 9) foi construído reunindo-se todos os isolados do Brasil e de outros países. Os isolados do Brasil e de outros países formaram grupos com os mesmos isolados com os quais agruparam-se nas análises separadas dos dendrogramas do Brasil e de outros países (figuras 6 e 7). Foram formados 7 grupos com nível de similaridade superior a 60%. Os isolados NRRL5851, CM01-05, 98041 e BS16M1 não agruparam-se nesta condição. O Grupo 1 foi formado pelos isolados Dt2, Dt4 e Dt5. O Grupo 2 foi constituído pelos isolados 91, 98023, 98043, 98021, 1972, A20, Dt1 e BS9. O Grupo 3 reuniu os isolados Dt4, BO2002, 1992, 0892, 1792, 98042, 98006, 98040, 98029, 98032, 9828, 98013, 98019, 98004, CS12-13, CS11-10, BS52M1, BS18M2 e B2. O Grupo 4 reuniu os isolados 98031 e Dt3. O Grupo 5 foi formado pelos isolados 98010, 98011 e CV13. O Grupo 6 foi composto pelos isolados 1965 e CV48. Grupo 7 agrupou os isolados 98017, 98026,

98003, 98025, 98018, 98030, 98007, 98012, 98014, 98022, 98033, BS6M1, CS10-04, 104, 1978 e CF02-01. O isolado 98041 e BS16M1 reuniram-se com 54,5% de similaridade e com o isolado NRRL5851 com 44,4%. Os Grupos 1, 2 e 3 ligaram-se entre si com 57,1% de similaridade e com o Grupo 4 com 25%, estes reuniram-se aos grupos 5 e 6 e aos isolados NRRL5851, 98041 e BS16M1 com 18,2%. O isolado CM01-05 agrupou-se com o Grupo 7 com 50% de similaridade, sendo que estes não apresentaram nenhuma similaridade com os outros grupos.

0 5 10 15 20 25
+-----+-----+-----+-----+-----+

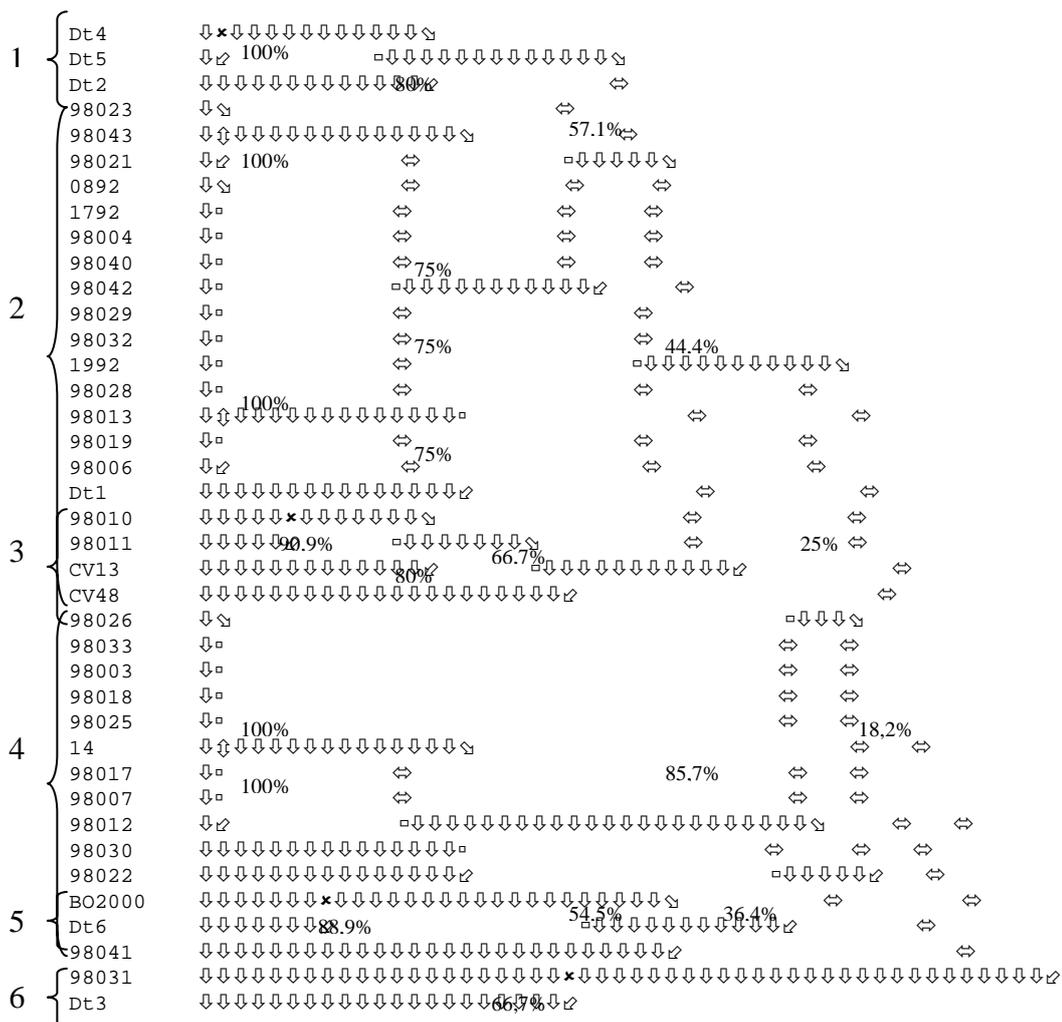
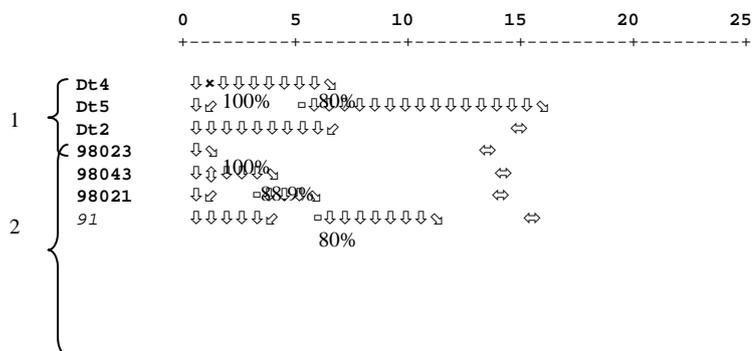


FIGURA 7. Dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana.



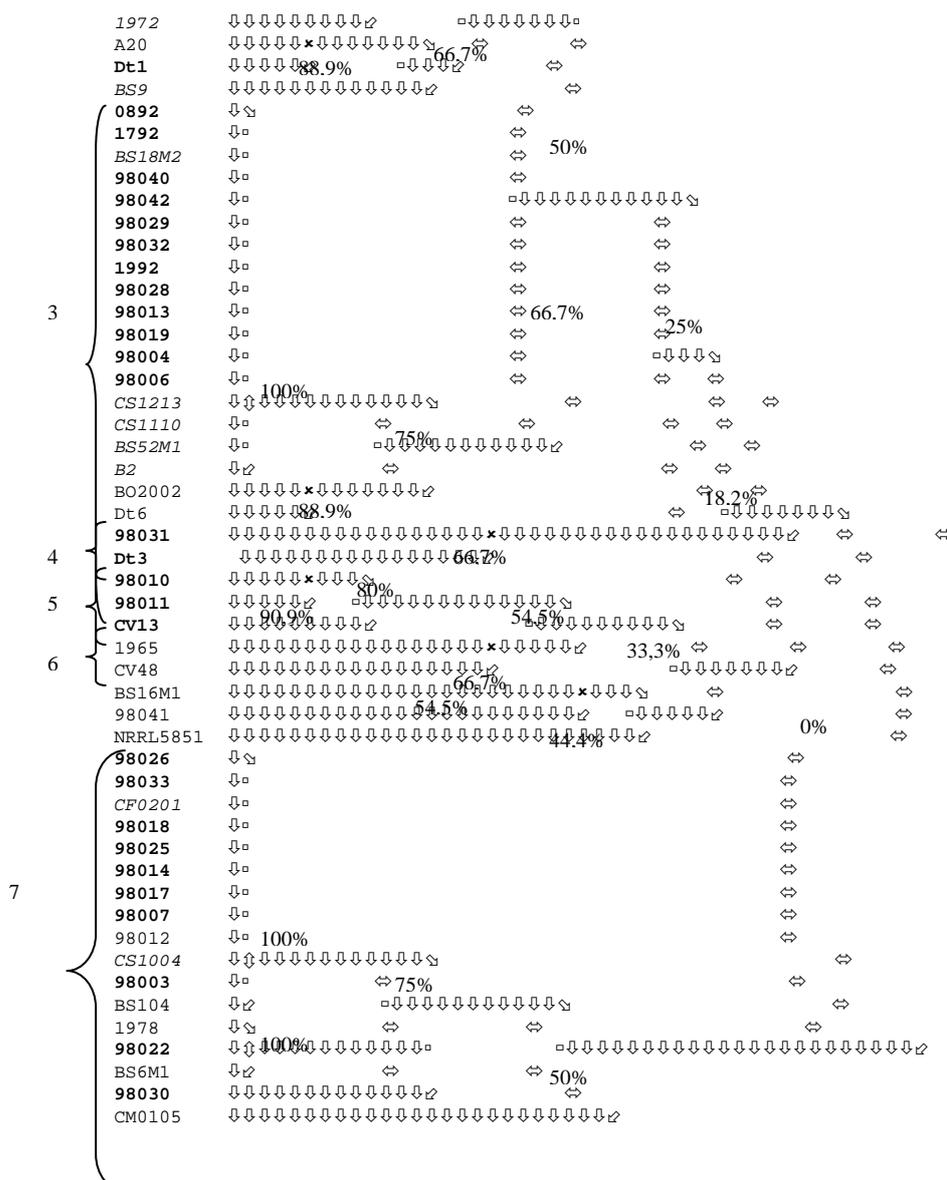


Figura 8. Dendrograma de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil e de outros países. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana. Em itálico estão os isolados de outros países que permaneceram no mesmo agrupamento no dendrograma de ARDRA-ITS1 de isolados de outros países com índice de similaridade >60%. Estão em negrito os isolados do Brasil que também ficaram no mesmo agrupamento no dendrograma de ARDRA-ITS1 de isolados do Brasil com índice de similaridade >60%.

Comparando-se os resultados dos dendrogramas da análise separada de ARDRA-ITS1 dos isolados do Brasil (figura 7) e dos isolados de outros países (figura 6), é possível constatar que os grupos 1 e 4 do dendrograma desta análise (figura 8) correspondem, respectivamente, aos grupos 1 e 6 do dendrograma da figura 7, conservando inclusive os mesmos índices de similaridade. Os outros grupos formaram grupos mistos, contendo isolados do Brasil e de outros países (figura 8). O isolado NRRL5851, que havia ficado agrupado com 66,7% de similaridade com os isolados do Grupo 4 da figura 6, apresentou similaridade de 18,2% com esses mesmos isolados no dendrograma desta análise. O isolado 98041, que havia ficado agrupado com os isolados BO2002 e Dt6 com 54,5% de similaridade (Grupo 5, figura 7), ligou-se ao isolado BS16M1 com este mesmo índice de similaridade no dendrograma da figura 9. Os isolados CM01-05 (Grupo7, figura 8) e BS18M2 (Grupo 3, figura 8), de mesma localidade geográfica, ficaram em grupos sem nenhuma similaridade entre si, ocorrendo o mesmo com os isolados 98018 (Grupo 7, figura8) e 98023 (Grupo 2, figura 8). Os isolados 0892, 1792 e 1992, da mesma localidade geográfica, ficaram ligados com 100% de similaridade nos dendrogramas das figura 7 e 8. O isolado BO2002 (*B. oryzae*) ligou-se com 88,9% de similaridade com o isolado Dt6 (*D. teres*) no dendrograma da figura 7 e no da figura 8, sendo que, no dendrograma da figura 7, os índices de similaridade com os isolados restantes variou de 18,2% a 36,4%; nesta análise, o índice de similaridade com isolados de *B. sorokiniana* foi de 75%.

4.6 Análise dos dendrogramas de ARDRA-ITS2 dos isolados

4.6.1 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados de outros países

O dendrograma da figura 9 foi construído a partir da análise de *B. sorokiniana* provenientes da Dinamarca, França, Canadá, Bélgica, Turquia, México, Nepal, Vietnã, Bangladesh e África do Sul. O grau de similaridade entre os isolados variou de 27,3% a 83,7%. Não houve nenhum agrupamento com nível de similaridade de 100%. Em um nível de similaridade >60% formaram-se 6 grupos e 4 isolados ficaram sem agrupar-se. O Grupo 1 foi formado pelos isolados BS6M1, CM01-05 e CS10-04, o Grupo 2 foi formado pelos isolados BS18M2 e BS52M1. O Grupo 3 reuniu os isolados NRRL5851, A20 e o Grupo 4 foi formado pelos isolados 1972 e BS16M1. O Grupo 5 agrupou os isolados BS9 e B2 e o Grupo 6 reuniu os isolados CS1213, 1978 e 104. Os Grupos 5 e 6 agruparam-se entre si com 45,5% de similaridade e com 40,9% de similaridade com o isolado 91 e aos demais grupos com 27,3%. Os isolados 1965 e CS11-10, que não se agruparam, ligaram-se com um nível de similaridade de 58,8% entre si. Estes isolados apresentaram níveis de similaridade de 54,1% com o Grupo 2 que uniu-se ao Grupo 1 com índice de similaridade de 47,6%. Este grande grupo uniu-se ao Grupo 3 com 36,8% e formaram um agrupamento maior que ligou-se ao Grupo 4 com 32,7% de similaridade.

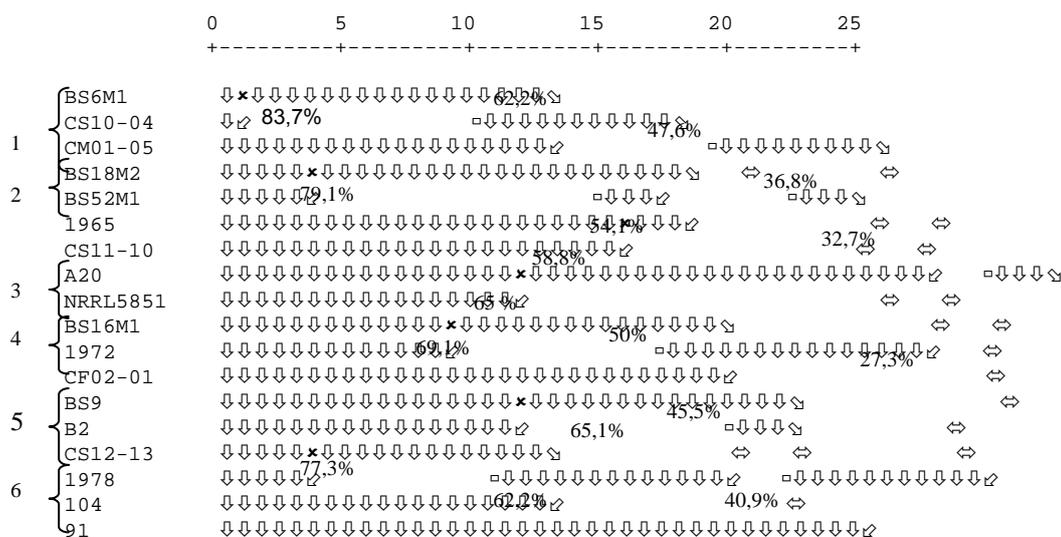


Figura 9. Dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados de outros países. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana.

4.6.2 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil

De acordo com o dendrograma da Figura 11 os índices de similaridade dos grupos variaram entre 25,6% a 83,3%. Foram formados 13 grupos com um nível de similaridade >60% e os isolados 98033 e 98018 não agruparam-se. O Grupo 1 reuniu los isolados 98003, 9804 e 98014 e o Grupo 2 reuniu os isolados 98007, 98026, 98028, 98017 e 98019. O Grupo 3 foi formado pelos isolados Dt1 e Dt6 e o Grupo 4 pelos os isolados Dt5 e 98031. O Grupo 5 agrupou os isolados, 98010, 98012 e 98030, 98023 e 98041 e o Grupo

6 foi formado pelos CV48, Dt2 e Dt4. O Grupo 7 foi formado pelos isolados 1992 e 98022 e o Grupo 8 pelos isolados 1792 e 980021. O Grupo 9 reuniu os isolados CV13, 98013 e 98029. O Grupo 10 foi formado pelo isolado BO2002 e 98006 e o Grupo 11 pelos isolados 98011, 98025, 98040 e 0892. O Grupo 12 agrupou os isolados Dt3 e 98042 e o Grupo 13 os isolados 98032 e 98043. Os Grupos 3 e 4 apresentaram entre si 48,8% de similaridade e com o Grupo 2, 43,9%. O isolado 98018 ligou-se ao Grupo 10 e 11 com 56,4% de similaridade e estes aos Grupos 12 e 13 com 42,9%. O Grupo 8 uniu-se ao Grupo 9 com 53,3% de similaridade e ao Grupo 7 com 48,9%. O Grupo 5 ligou-se ao Grupo 6 com 47,6% de similaridade e estes aos Grupos 1, 2, 3 e 4 com 30%. Esse grande grupo formado pelos Grupos 1, 2,3, 4, 5 e 6 ligou-se aos demais com similaridade de 25,6%.

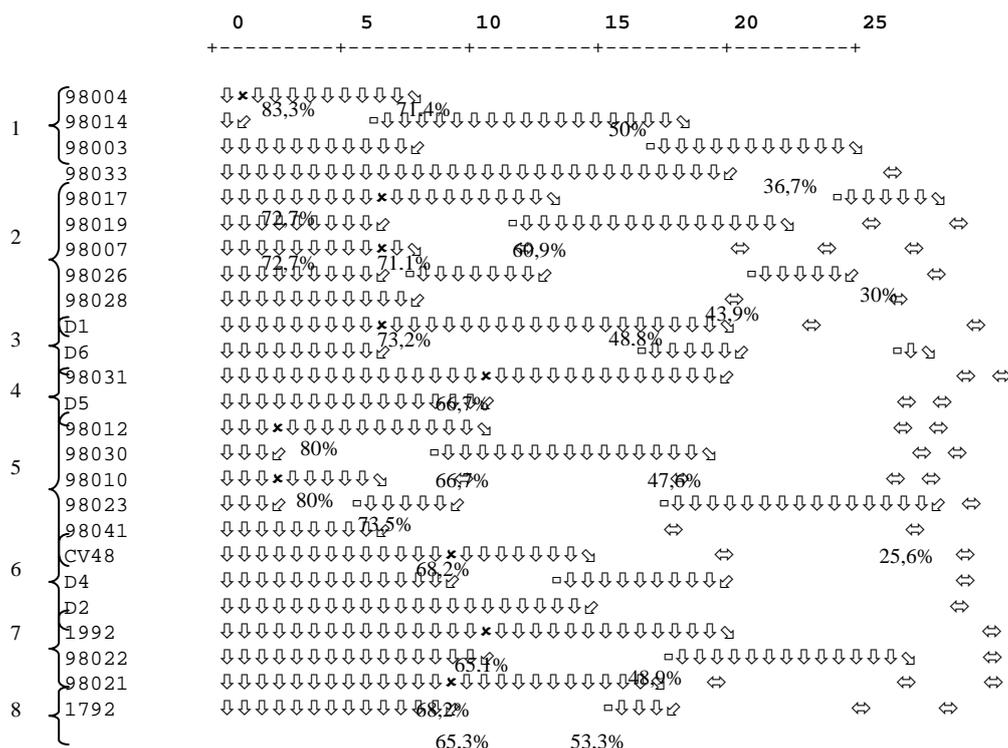




Figura 10. Dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana.

4.6.3 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil e de Outros Países

No dendrograma construído a partir das análises dos dados dos isolados do Brasil e de outros países (figura 11), os índices de similaridade apresentados pelos grupos variaram de 21,6% a 83,7%. Assim como ocorreu no dendrograma dos isolados brasileiros (figura 10) e no dendrograma dos isolados de outros países (figura 9), nenhum grupo foi formado com índice de similaridade de 100%. Formaram-se 20 grupos com um nível de similaridade >60% e o isolado 98022 ficou sem agrupar-se. No dendrograma dos isolados de outros países (figura 9), os isolados 1965, 91, CS11-10 e CF01-01 não haviam formado grupos. Contudo, nesta análise eles se inseriram em novos grupos que se formaram. O Grupo 1 foi composto pelos isolados CV13, BS6M1, 98013 e CS10-04 e o Grupo 2 pelos isolados 1978 e CS12-13. O Grupo 3 reuniu os isolados 98017, 98019, 98007, 98026 e 98028 e o Grupo 4

os de Dt3 e 98042. O Grupo 5 agrupou os isolados 98010, 98023, 98030, 98041 e 98012. O Grupo 6 formou-se com os isolados 98021, 1792 e 104 e o Grupo 7 com os isolados A20 e NRRL5851. O Grupo 8 foi organizado pelos isolados 98032 e CF02-01 e o grupo 9 pelos isolados BS18M2 e BS52M1. O Grupo 10 foi constituído pelos isolados 1965, 98043 e BO2002 e o Grupo 11 pelos isolados 1992, 0892, CS11-10, 98011 e 98025. O Grupo 12 foi formado pelos isolados 98040, BS9 e B2 e o Grupo 13 pelos isolados CV48 e 91. O Grupo 14 foi composto pelos isolados 98031 e Dt5 e o Grupo 15 foi formado pelos isolados Dt1 e Dt6. O Grupo 16 reuniu os isolados Dt2 e Dt4 e o Grupo 17 os isolados 98033, BS16M1 e 1972. O Grupo 18 foi formado pelos isolados 98004, 98003 e 98014 e o Grupo 19 pelos isolados 98006 e 98018. O Grupo 20 agrupou os isolados CM01-05 e 98029. Os Grupos 1 e 2 reuniram-se com um nível de similaridade de 54,5% e com o Grupo 3 em 50%. O isolado 98022 reuniu-se ao Grupo 12 com 52,2% de similaridade e com o Grupo 11 com 47,4%. O Grupo 4 ligou-se aos Grupos 1,2 e 3 com 41,9% de similaridade e estes com o Grupo 5 com 38,1%. O Grupo 6 e 7 uniram-se com 48,9% de similaridade. O Grupo 8 uniu-se aos Grupos 9 e 10 com 47,6% e estes com os Grupos 11 e 12 com 36,8%. O Grupo 13 uniu-se ao 14 com um nível de similaridade de 55,8%, estes se agruparam com os Grupos 17, 18, 19 e 20 com 29,8%. Dois grandes grupos formaram-se, um contendo os Grupos 1, 2, 3, 4, 5,6 e 7 unidos com 34,1% de similaridade e outro contendo os Grupos 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 unidos em 27,3%. Os dois grandes grupos reuniram-se com nível de similaridade de 21,6%.

Os Grupos 1, 2, 3, 4 e 5 da figura 10 corresponderam, respectivamente, aos Grupos 18, 3, 15, 14 e 5 do dendrograma da figura 11. Os demais grupos da figura 11 foram formados pela reunião de isolados do Brasil e de outros países. Os isolados 91 (Turquia), 1965 (Dinamarca) e CS11-10 (Bangladesh), que haviam ficado sem agrupar-se no dendrograma da figura 9, formaram os Grupos 13, 10 e 11, respectivamente, com isolados do Brasil (figura 11). Os isolados A20 e NRRL5851 que formaram o Grupo 3 (figura 9) e Grupo 7 (figura 11) apresentaram índice de similaridade entre si de 65%. O isolado BO2002, no dendrograma da figura 10, ficou ligado ao isolado 98006 com 72,7% de similaridade e no dendrograma de figura 12, ligou-se ao isolado 1965 com 72,3% e ao isolado 98043 com 66,7%. No dendrograma da figura 10, os isolados 0892, 1992 e 1792 ficaram em grupos separados, Grupos 11, 7 e 8, respectivamente. Entretanto, no dendrograma da figura 11, os isolados 0892 e 1792 reuniram-se no Grupo 11 com 61,9% de similaridade. Os isolados CM01-05 (Grupo 20) e BS18M2 (Grupo 10) na figura 11, que são da mesma localização geográfica, ligaram-se com 27,3% de similaridade. Do mesmo modo isolados do Brasil, como o 98018 e 98023 que são da mesma localidade, agruparam-se com baixo índice de similaridade, 21,6%.

4.7 Análise dos dendrogramas de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados

4.7.1 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados de outros países

De acordo com o dendrograma da Figura 13 os índices de similaridade dos grupos variaram entre 26,9% a 82,4%. Foram formados 6 grupos em um nível de similaridade >60%. Os isolados CF01-05, CM01-05 e BS9 ficaram sem agrupar-se. Os isolados CF02-01 e o isolado CM01-05 também aparecem sem agrupar-se no dendrograma da região ITS2 e no da região ITS1 respectivamente. O Grupo 1 foi formado pelos isolados BS6M1, CS10-04 e 1965 e o Grupo 2 pelos isolados 91 e B2. O Grupo 3 agrupou os isolados A20 e NRRL5851 e o Grupo 4 pelos isolados CS12-13, 1978 e 104. O Grupo 5 foi formado pelos isolados BS18M2, BS52M1 e CS11-10 e o Grupo 6 pelos isolados BS16M1 e 1972. O isolado BS9 ligou-se ao Grupo 3 com nível de similaridade de 56,6% e com os Grupos 4 e 5 com 47,8%, estes uniram-se aos Grupos 1 e 2 com 41,5%. O isolado CM10-05 reuniu-se com o isolado CF02-01 com 53,6% de similaridade e com o Grupo 6 com 46,7%, este reuniu-se com os demais Grupos com 26,9%.

4.7.2 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados do Brasil

No dendrograma da Figura 13 os índices de similaridade variaram de 29,8% a 82,9%. Formaram-se 14 grupos em nível de similaridade >60%. Os isolados Dt2 e 98022 ficaram sem agrupar-se. O Grupo 1 foi constituído pelos isolados 98004, 98014 e 98003 e o Grupo 2 pelos isolados 98007, 98026 e 98017. Grupo 3 reuniu os isolados 98019, 98026, 98018 e 98006 e o Grupo 4

os isolados 98031 e Dt5 e o Grupo 5 foi composto pelos isolados 98040, 0892, 1792 e 1992 e o grupo 6 pelos isolados 98043 e BO2002. O Grupo 7 agrupou os isolados 980290e CV13 e o Grupo 8 os isolados 98011 e 98025. O Grupo 9 foi formado pelos isolados Dt1 e Dt6 e o Grupo 10 agrupou os isolados CV48 e Dt4 e o Grupo 11 pelos isolados 98011, 98042 e Dt3. O Grupo12 foi composto pelos isolados 98028, 98041 e 98032, o Grupo 13 pelos isolados 98012, 98030, 98010, e 98023,o Grupo 14 pelos isolados 98021 e 98022. O isolado 98033 ligou-se ao Grupo 1 com nível de similaridade de 59% e o isolado Dt2 ao Grupo 10 com 58,8% de similaridade. Os grupos 2 e 3 uniram-se com 56,6% de similaridade e com o Grupo 1 com 43,1%. O Grupo 4 reuniu-se aos Grupos 1, 2 e 3 com 40,7% de similaridade e aos Grupos 5, 6, 7, 8, 9 e 10 com 30,8%, estes uniram-se aos Grupos 11, 12, 13 e 14 com 29,8%. O Grupo 6 ligou-se ao Grupo 7 com 58,8% de similaridade e ao Grupo 5 com 56%, estes reuniram-se aos Grupos 8, 9 e 10 com 40,8%. O Grupo 8 agrupou-se com o Grupo 9 com 59,3% de similaridade e com o Grupo 10 com 46,8%. O Grupo 11 reuniu-se ao grupo 12 com 52,8% e com os Grupos 13 e 14 com 39,2%. O Grupo 14 ligou-se ao Grupo 13 com 50% de similaridade.



Figura 11. Dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana. Estão em itálico os isolados de outros países que permaneceram no mesmo agrupamento no dendrograma de ARDRA-ITS2 dos isolados de outros países com índice de similaridade >60%. Estão em negrito os isolados do Brasil que mantiveram-se no mesmo agrupamento no dendrograma da análise de isolados do Brasil com índice de similaridade >60%.

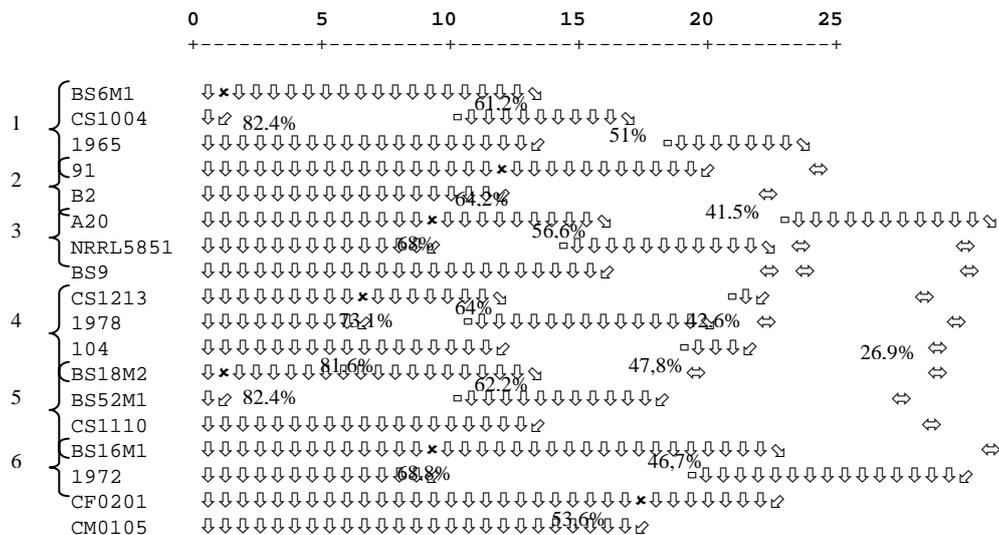


FIGURA 12. Dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados de outros países. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana.

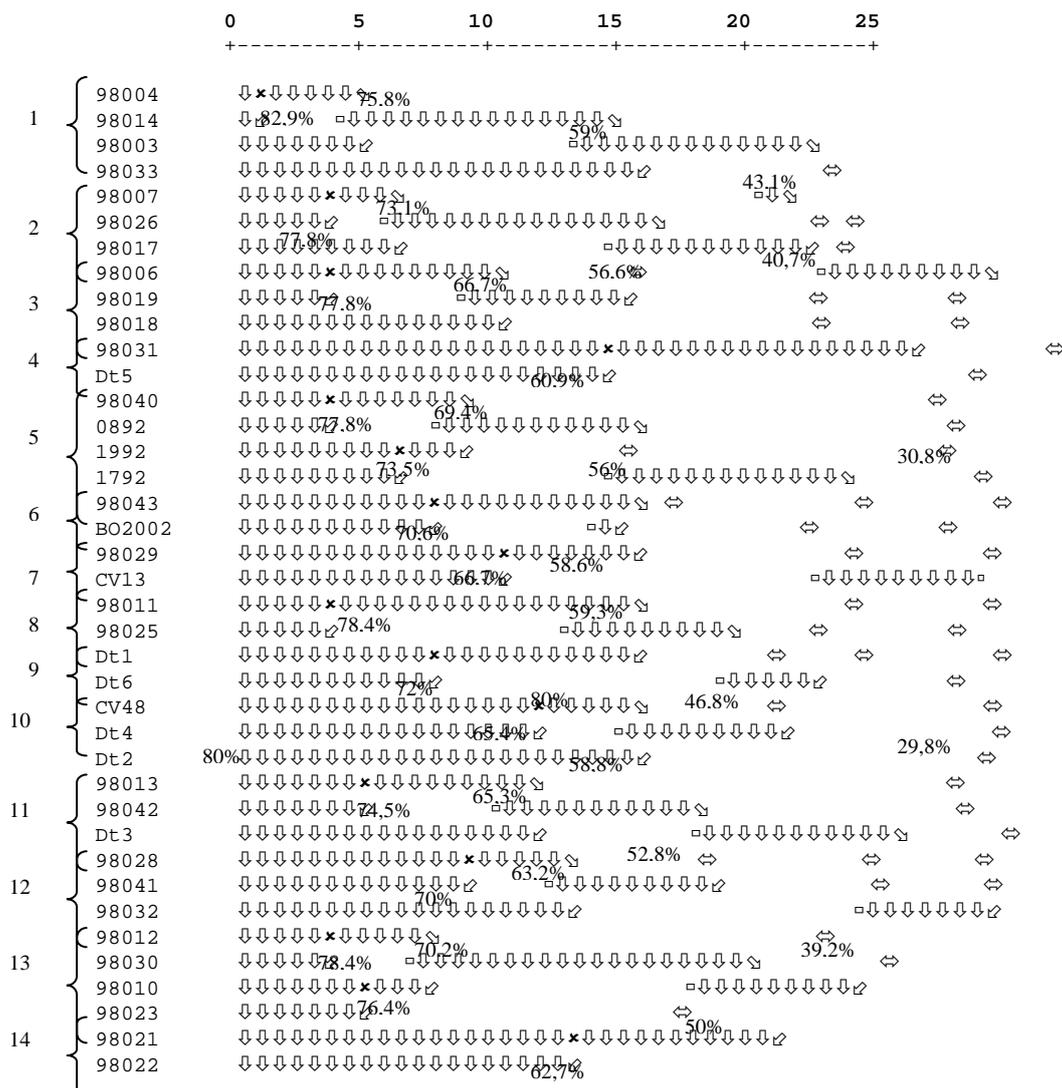


Figura 13. Dendrograma de ARDRA-ITS1 e ITS2 dos isolados do Brasil. Os valores das ramificações indicam a similaridade com que os grupamentos foram formados. A régua indica distância Euclidiana. Estão em negrito os

isolados do Brasil que mantiveram-se nos mesmos grupos no dendrograma da região ITS1 e no dendrograma da região ITS2 com índice de similaridade > 60%.

4.7.3 Análise do dendrograma de ARDRA-ITS1 e ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil e de outros países

De acordo com o dendrograma da Figura 14, obtido através da análise das duas regiões ITS juntas de todos os isolados do Brasil e de outros países, os índices de similaridade entre os grupos variaram de 18,2% a 82,9%. Foram formados 20 grupos em um nível de similaridade >60%. Os isolados Dt2, BS9, CF02-01 e CM01-05 ficaram sem agrupar-se. O Grupo 1 foi formado pelos isolados 98004, 98014 e 98003, o Grupo 2 pelos isolados 98007, 98026 e 98017 e o Grupo 3 pelos isolados 98019, 98018 e 98006. O Grupo 4 reuniu os isolados 98011 e 98025, o Grupo 5 os Dt1 e Dt6 e o grupo 6 os isolados CV48 e Dt4. O Grupo 7 foi composto pelos isolados 98040, 0892, 1992 e 1792, o Grupo 8 pelos isolados 98043 e BO2002, o Grupo 9 pelos isolados 98029 e CV13. O Grupo 10 agrupou os isolados 98031 e Dt5, o Grupo 11 os isolados 91 e B2 e o Grupo 12 os isolados CS10-04, BS6M1 e 1965. O Grupo 13 agrupou os isolados 98013, 98042 e Dt3, o Grupo14 os isolados 98028, 98041 e 98032 e o Grupo 15 os isolados 98012, 98030, 98010, e 98023. O Grupo 16 reuniu os isolados 98021 e 98022, o Grupo 17 los isolados A20 e NRRL5851 e o Grupo 18 foi constituído pelos isolados CS12-13, 1978 e 104. O Grupo 19 foi formado pelos isolados BS18M2, Bs52M1 e CS11-10 e o Grupo 20 pelos isolados BS16M1, 98033 e 1972. O isolado Dt2 ligou-se ao Grupo 6

com nível de similaridade de 58,8%. O isolado BS9 ligou-se ao Grupo 17 com 56,6% de similaridade. O CF02-01 agrupou-se com o isolado CM01-05 com 53,6% de similaridade e com o Grupo 20 com 37,3%. O Grupo 2 ligou-se ao Grupo 3 com 56,6% de similaridade e ao grupo 1 com 47,6%, este reuniu-se aos Grupos 4, 5 e 6 com 41,7%. O Grupo 8 ligou-se ao 9 com 58,8% de similaridade e com o Grupo 7 com 56%, este ligou-se aos grupos 10, 11 e 12 com 36,7%. O Grupo 12 reuniu-se ao Grupo 11 com 51% de similaridade e com o Grupo 10 com 41,7%. O Grupo 16 reuniu-se ao 15 com 50% de similaridade e com os Grupos 13 e 14 com 39,2%. O Grupo 17 e o isolado BS9 reuniram-se ao Grupos 18 e 19 com 42,6% e com o Grupo 20 e os isolados CF02-01 e CM01-05 com 26,9%. O Grupo 13 ligou-se ao 14 com 52,8% de similaridade, estes e os Grupos 15 e 16 reuniram-se aos Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 12 com 29,6%. Este grande grupo ligou-se aos grupos restantes com 18,2% de similaridade.

Os Grupos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 8, 10, 13, 14, 15 e 16 da figura 14 foram constituídos pelos mesmos isolados dos Grupos 1, 2, 3, 8, 9, 10, 5, 6, 7, 4, 11, 12, 13 e 14 da figura 13, respectivamente. Os Grupos 11, 12, 17, 18, 19 e 20 da figura 14 foram formados pelos mesmos isolados dos Grupos 2, 1, 3, 4, 5 e 6 da figura 12, respectivamente. Os isolados 0892, 1792 e 1992 reuniram-se no mesmo grupo nos dendrogramas das figuras 13 e 14. O Grupo 20 da figura 14 foi formado pelo isolado 98033 que ficou sem agrupar-se, do dendrograma de isolados do Brasil, e os isolados do Grupo 6 do dendrograma de isolados de outros países. Os isolados BS9, CF02-01 e CM01-05 ficaram sem agrupar-se

nos dendrogramas das figuras 12 e 14. O isolado Dt2 ficou sem agrupar-se nos dendrogramas das figuras 13 e 14.

Não houve separação de isolados por origem geográfica, pois isolados como, CM01-05 (Veracruz-México) e BS18M2 (Veracruz-México) (figuras 6, 11, 12 e 14), apesar de pertencerem a mesma localidade, tiveram entre si índices de similaridade menores, e até mesmo ausência total de similaridade (figura 8). Entretanto, isolados de localidades diferentes como BS18M2 (Veracruz-México) e BS52M1 (Nuevo Leon-México) associaram-se a isolados de diferentes estados do Brasil com índices de similaridade de 100% (figura 8). Além disso, isolados de continentes diferentes, como foi o caso, por exemplo, dos isolados A20 (Canadá) e NRRL5851 (África do Sul), agruparam-se com índices de similaridade superiores a 60% (figuras 6, 9, 11, 12 e 14). Também não foi possível separar os isolados de diferentes espécies, uma vez que, isolados de *D. teres* formaram entre si e com isolados de *B. sorokiniana* e *B. oryzae* grupos com índice de similaridade superior a 60%. Além disso, o isolado Dt3 (*D. teres*) ligou-se com os outros isolados da mesma espécie com índices de similaridade que variaram de 18,2% a 25,6% (figura 7, 10, 11, 13 e 14) e o isolado Dt1 ora agrupou-se com isolados de *B. sorokiniana*, com similaridade de 75 a 88% (figuras 7 e 8), ora com o isolado Dt6, com similaridade de 72 a 73,2% (figuras 10, 11, 13 e 14).

Esses resultados levam a sugerir que esteja ocorrendo fluxo genético entre as diferentes populações do fitopatógeno de localidades geográficas distantes, possivelmente, através de sementes infectadas pelo fungo, pois nem sempre é possível determinar, pelo exame visual de sintomas

nas sementes, se os grãos estão contaminados e freqüentemente sementes, aparentemente saudáveis, podem estar infectadas com *B. sorokiniana*. Assim, o comércio mundial de grãos pode estar colaborando para superar as barreiras geográficas entre as populações do fitopatógeno. Outra possibilidade seria o transporte de grãos infectados de uma região para outra através de aves migratórias. Além disso, algumas cultivares de trigo desenvolvidas pela Embrapa (Brasil) foram resultantes do cruzamento entre cultivares brasileiras e mexicanas, durante esse processo, poderia ter ocorrido a entrada no Brasil de sementes ou mudas infectadas pelo fungo, isso justificaria a ocorrência de isolados do México agrupados com isolados do Brasil com 100% de similaridade (figura 8). Embora isolados de outros países como CS11-10 (Bangladesh) e B2 (Turquia) também tenham associado-se a isolados do Brasil com esse mesmo índice de similaridade (figura 8).

Também, pode-se sugerir a ocorrência de fluxo genético entre as diferentes espécies desse estudo, uma vez que o isolado Dt3 (*D. teres*) apresentou maior similaridade com isolados de *B. sorokiniana* do que com os de sua espécie. O isolado Dt1 maior similaridade com isolados de *B. sorokiniana* (figuras 7 e 8) na análise de ARDRA-ITS1, ficando na análise de ARDRA-ITS2, bem como na de ARDRA-ITS1 e 2, mais próximo geneticamente com isolados de sua espécie (figuras 10, 11, 13 e 14).

As versões diferentes de ITS encontradas em todos os isolados poderia ser um indício da ocorrência de hibridização entre espécies, que seria resultante da anastomose entre hifas de espécies diferentes e a cariogamia. Nesse caso, o híbrido poderia acabar perdendo o ciclo sexual como resultado

da hibridização. Sem a recombinação sexual, haveria perda de variabilidade. Assim, a hibridização interespecífica seria um mecanismo para aumentar a variabilidade genética (Moon et al, 2002). No caso de *B. oryzae* e *B. sorokiniana*, o estado sexual não ocorre naturalmente na natureza. Dessa forma, a hibridização seria um mecanismo importante para essas espécies. Se a hibridização realmente ocorre, as versões diferentes de ITS estariam presentes no mesmo núcleo. Se estiverem em núcleos diferentes seria uma evidência de heterocariose, o que não impediria a ocorrência de cariogamia e recombinação mitótica (ciclo parassexual) que levaria a formação de núcleos híbridos. Em *Puccinia graminis* foi relatado por Nelson et al (1955) o surgimento de novos biotipos, mais virulentos do que os parentais, resultantes da anastomose entre hifas de raças diferentes e subsequente troca de núcleos levando a formação de heterocariose. O isolado BO2002 (*B. oryzae*) esteve associado, nos dendrogramas das figuras 7, 10, 11, 13 e 14, com isolados de *D. teres* ou com isolados de *B. sorokiniana* com maior frequência e com maior índice de similaridade do que com isolados de outros países, o mesmo ocorrendo com isolados de *D. teres*. O que reforça a possibilidade de que esteja ocorrendo fluxo genético entre as espécies desse estudo, principalmente porque compartilham os mesmos nichos, o que favorece a troca de material genético.

Uma questão importante é como espécies diferentes são capazes de trocar material genético entre si. Os micologistas têm opiniões diferentes sobre a classificação de espécies separadas do gênero *Helmithosporium*, como é o caso dos gêneros *Drechslera*, *Bipolaris* e *Exserohilum*. Alguns deles, não

reconhecem os gêneros *Bipolaris* e *Exserohilum*, mas reconhecem o gênero *Drechslera* incluindo os outros dois dentro deste gênero. A argumentação baseia-se nas diferenças da morfologia conidial, usadas para separar as 3 gêneros, são muito pequenas para justificar a separação (Zhang & Berbee, 2001). Zhang & Beerbee (2001) seqüenciaram as regiões ITS e os genes codificantes da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de isolados de diferentes espécies de *Bipolaris*, *Exserohilum* e *Drechslera*. Os autores verificaram que as espécies de *Drechslera* formavam um grupo monofilético e *Exserohilum* e *Bipolaris* formavam um único grupo contendo espécies de ambos os gêneros. No entanto, as espécies *D. biseptata*, *D. dematioidea* e *D. triseptata*, apesar de apresentarem características morfológicas distintas; que levou os micologistas a sugerir a criação de um gênero novo (*Marelliottia*), foram mantidas no gênero *Drechslera*. A espécie *D. gigantea*, que também é atípica, foi incluída como sendo pertencente ao gênero *Bipolaris* (Zhang & Berbee, 2001). Nos resultados do estudo realizado por Weikert-Oliveira et al. (2002), utilizando RFLP-ITS, com isolados de *B. sorokiniana*, *B. oryzae* e *E. turcicum*, houve separação entre alguns isolados de *B. sorokiniana* e *B. oryzae*, no entanto, os isolados de *E. turcicum* agruparam-se com isolados de *B. sorokiniana*, um isolado de *B. sorokiniana* ficou sem agrupar-se e dois isolados de *B. oryzae* formaram um grupo em separado. Berbee et al. (1999) estudando a filogenética de *Cochliobolus*, através da amplificação das duas regiões ITS mais o fragmento 5.8S com oligonucleotídeos universais (ITS5-ITS4), identificou um grupo muito similar que reuniu as espécies mais virulentas do gênero, entre elas *C. sativus*. Nesse grupo, dois isolados desta espécie

ficaram agrupados com maior nível de similaridade com isolados de *C. heterostrophus* e um isolado agrupou-se com maior nível de similaridade com *C. eleusines*.

outros países com índice de similaridade >60%. Estão em **negrito** os isolados do Brasil que também mantiveram-se agrupados juntos no dendrograma de ARDRA-ITS1 e ARDRA-ITS2 dos isolados do Brasil com índice de similaridade >60%.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem fazer as seguintes afirmações:

- 1) O PCR-ITS da região ITS1 do rDNA dos isolados de *B. sorokiniana* revelou a presença de polimorfismos intra-específicos;
- 2) O ARDRA-ITS das regiões ITS1 e ITS2 demonstrou polimorfismos intra-específicos e interespecíficos entre os isolados;
- 3) A análise dos dendrogramas obtidos a partir dos resultados de ARDRA-ITS não permitiu agrupar os isolados de acordo com a região geográfica e tipo de hospedeiro;
- 4) A região ITS2 apresentou maior número de sítios para análise com endonucleases de restrição do que a região ITS1.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para dar continuidade a este estudo sugerimos que:

-utilize-se a combinação de duas endonucleases de restrição para analisar as regiões ITS.

-Seja realizado o seqüenciamento dos diferentes fragmentos das regiões ITS, levando-se em conta a presença de versões diferentes de ITS que foram encontradas.

-Seja feito o estudo da região IGS (espaço intergênico do DNA ribossomal) dos isolados com endonucleases de restrição.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AANEN, D. K.; KUYPER, T. W.; HOEKSTRA R. F. A widely distributed ITS polymorphism within a biological species of the ectomycorrhizal Fungus *Hebeloma velutipes*. **Micologia Research**, Cambridge, v. 105, n.3, p.284-290, 2001.

ALCORN, J.L. The taxonomy of "*Helminthosporium*" species. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 26, p.37-56, 1988.

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

ANDERSEN, P. W.; FAIRBANKS, D. J. Molecular markers: Important Tolls for plant genetics resource characterization. **Diversity**, Washington, v.6, p.51-53,1990.

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

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

BALESDENT, M.H.; JEDRYCZKA, M.; JAIN, L.; MENDES-PEREIRA, E.; BERTRANDY, J.; ROUXEL, T. Conidia as a substrate for internal transcribed spacer-based PCR identification of members of the *Leptosphaeria maculans* species complex. **Phytopathology**, St. Paul, v.88, n.11, 1998.

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**, Bronx v.91, n.6, p.964-977, 1999.

CARRANZA, S.; GIRIBERT, G.; RIBERA, C.; BAGUÑA, J.; RIUTORT, M. Evidence that types of rDNA coexist in the genome of *Dugesia (Schidtea) mediterranea* (Platyhelminthes, Turbellaria, Tricladida). **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 13, n. 6, p. 824-832, 1996.

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

COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO. **Indicações técnicas**. Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2001.

COMISSÃO SUL-BRASILEIRA DE PESQUISA DE TRIGO. **Indicações técnicas** . Passo Fundo, RS: Embrapa Trigo, 2003.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços**. Disponível em: <http://www.conab.gov/sementes> de cevada. Acesso em: 25 abr. 2004.

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

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

CHRISTENSEN, J.J. The influence of temperature on the frequency Of mutation in *Helminthosporim sativum*. **Phytopathology**, St. Paul, v.19, p.155-162, 1929.

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

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

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

CYMMIT- (México) Centro Internacional de Melhoramento de Trigo e Milho México. **Contém informações institucionais, técnicas, notícias, projetos, publicações e serviços.** Disponível em: <<http://www.cimmyt/wheat> in the developing world. Acesso em: 25 abr. 2004.

DAY, P.R. **Genetics of host-parasite interaction.** San Francisco, 1974. 238p.

FENTON, B.; MALLOCH, G.; GERMA, F. A study of variation in rDNA ITS regions shows that two haplotypes coexist within a single aphid genome. **Genome**, Ottawa, v. 41, p. 337-345, 1998.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPLAGLIA, D. **Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em análise genética**. 2 ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1985. 220p.

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

FORCELINI, C.A. Tratamento de sementes de trigo no Brasil. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, 2., 1995, Piracicaba. **Anais: Patógenos em sementes : Detecção, Danos e Controle Químico**. [Piracicaba], 1995. P. 246-264.

FRANK, S.A. Models of plant pathogen coevolution. **Trends in Genetics**, Amsterdam, v8, n. 6, 1992.

FUNGARO, M.H.P. PCR na Micologia. **Biotecnologia Ciência e desenvolvimento**, Brasília, n.14. p. 22–25, 2000.

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

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. 1985. p. 1-11.

HAWKSWORTH, D.L. Fungal genera in urgent need of taxonomic work. **Microbiological Sciences**, Oxford, v.3, n. 2, p.58, 1986.

HOSNY, M.; HIJRI, M.; PASSARIEUX, E.; DULIE, H. Intraspecific ITS polymorphism in *Scutellospora castanea* (Glomales, Zygomycetes). **Gene**, Amsterdam, v.226, p. 61-71, 1999.

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.

JAMES, T.Y.; MONCALVO, J.; LI, S.; VILGALYS, R. Polymorphism at the ribosomal DNA spacers and Its relation to breeding structure of the widespread mushroom *Schizophyllum commune*. **Genetics**, Austin, v. 157, p. 149-161, 2000.

JENNINGS, D. H.; LYSEK, G. **Fungal Biology**: understanding the fungal lifestyle. 2. ed. Oxford: Bios Scientific Publishers, 1999. p.116-117.

KAREN, O; HÖGGERG, N.; DAHLBERG, A. Inter- and intraspecific variation in the ITS region of rDNA of ectomycorrhizal fungi in *Fennoscandia* as detected by endonuclease analysis. **New Phytology**, Cambridge, v. 136, p.313-325, 1997.

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

KO, K.S.; JUNG, H.S. Three nonorthologous ITS1 types are present in a polypore fungus *Trichaptum abietinum*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v. 23, p.112-122, 2002.

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

LE CAM, B.; DEVAUX, M.; PARISI, L. Specific polymerase chain reaction identification of *Venturia nashicola* using internally transcribed spacer region in the ribosomal DNA. **Phytopathology**, St Paul, v.91, n.9, p.900- 904, 2001.

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

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

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

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

MOON, C.D.; MILES, C.O; JARLFORS, U.; SCHARDL, C.L. The evolutionary origins of three new *Neotyphodium* endophyte species from grasses indigenous to the Southern Hemisphere. **Mycologia**, Bronx, v. 94, n. 4, p. 694-711, 2002.

MORAES-FERNANDES, M. I. B. **Trigo no Brasil: Citogenética**. Campinas: Fundação Cargill, 1982. v.1, p. 97-114.

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.

MÜLLER, M.V.G. **O estudo da variabilidade morfológica e uso de amplificação randômica de DNA polimórfico (RAPD na caracterização de isolados de *Bipolaris sorokiniana***, 2000.135 fl. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2000.

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

NELSON, R.R.; WILCOXSON, R.D.; CRISTENSEN, J.J. Heterocariosis as a basis for variation in *Puccinia graminis* var. tritici. **Phytopathology**, St. Paul, v. 45, p. 581-638, 1955.

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

NUSS, D.L.; KOLTIN, Y. Significance of dsRNA genetic elements in plant pathogenic fungi. **Annual Review Phytopathology**, Palo Alto, v. 28, p. 37- 58, 1990

O'DONNELL, K.; CIGELNIK, E. Two divergent intragenomic rDNA ITS2 Types within a monophyletic lineage of the fungus *Fusarium* are nonorthologous. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.7, n.1, p.103-116, 1997.

OLIVEIRA, A. M. R. **Estudo da variabilidade genética em *Bipolaris sorokiniana* utilizando técnicas moleculares** . 1995. 116 fl. Dissertação (Mestrado) -Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1995.

OLIVEIRA, V.C.; COSTA, J.L.S. Análise de restrição de DNA ribossomal amplificado (ARDRA) pode diferenciar *Fusarium solani* f sp. *Phaseoli* de *F. solani* f sp. *Glycines*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.27, n.6, p.631-634, 2002.

PRESTES, A.M. Transmissão de *Septoria nodorum* das sementes para órgãos aéreos do trigo. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE TRIGO, 14., 1986, Londrina. **Resultados de Pesquisa**. Passo Fundo: Embrapa - CNPT, 1986.

PRYOR, B. M. ; MICHAILIDES, T. J. Morphological, pathogenic, and molecular characterization of *Alternaria* sp isolates associated with alternaria late blight of pistachio. **Phytopathology**, St. Paul, v.92, p.406-416, 2001.

REDECKER, D.; THIERFELDER, H.; WALKER, C.; WERNER, D. Restriction analysis of PCR- amplified internal transcribed spacer of ribossomal DNA as a tool for species identification in different genera of the order Glomales. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.63, p.1756-1761, 1997.

REDECKER, D.; HIJRI, M.; DULIEU, H.; SANDERS, I. Phylogenetic analysis of a dataset of fungal 5.8S rDNA sequences shows that highly divergent copies of internal transcribed spacers reported from *Scutellospora castanea* are of Ascomycete origin. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v.28, p.238-244, 1999.

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

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

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.

REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA DE CEVADA, 21, Passo Fundo, 2001. v. 1.

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

SANTOS, A. M.P.V. **Análise enzimática da região ITS (internal transcribed spacer) do DNA ribossomal e da patogenicidade em isolados de *Bipolaris sorokiniana*.** 2001. 121 f. Dissertação (Doutorado)- Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2001.

SHI, Y.L.; CHRISTIAN, D.; CARRIS, L.M.; LEUNG, H. Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. **Phytopathology**, St. Paul, v.86,n.3, p. 311-318, 1996.

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

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

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

TINLINE, R.D.; CHINN, S.H.F. Inherent germinability and survival of spores of *Cochliobolus sativus*. **Phytopathology**, St. Paul, v.54 , p. 349-352, 1963.

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

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

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

TZENG, T.; LYNHOLM, L.K.; FORD, C.F.; BRONSOSN, C.R. A Restriction fragment length polymorphism map and electrophoretic karyotype of the fungal maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. **Genetics**, Austin, v.30, p.81-96, 1992.

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

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

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

ZHANG,G.;BERBEE, M.L. *Pyrenophora* phylogenetics inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. **Mycologia**, Bronx, v. 91, n. 6, p. 1048-1063, 2001.

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

8. APÉNDICE

8.1 Meios de cultura e soluções utilizadas

8.1.1 Meio de cultura BDA

4g Infuso de batata

40g dextrose

15g ágar

Água destilada para completar 1000ml

6.1.2 Meio de cultura BD (Batata – Dextrose)

200g batata

20g dextrose

Água destilada para completar 1000ml

8.1.3 Solução de Lactofenol

20ml ácido láctico

20g cristais de fenol

40ml glicerina

0,05g azul de Porrier (coton blue)

Água destilada para completar 100ml

8.1.4 Tampão de extração de DNA

200mM Tris-HCl pH 8,0

250 mM NaCl

25 mM ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) pH 8,0

1% V/V dodecil sulfato de sódio (SDS)

1% β - mercaptoetanol

8.1.5 Clorofórmio-álcool isoamílico

24 volumes clorofórmio

1 volume álcool isoamílico

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

50 ml água destilada

6 ml Tris pH 8,8

12,5 ml m-cresol

0,5 ml β -mercaptoetanol

7,5 ml NaOH 1N

Ajustar pH com pastilhas de NaOH

8.1.7 Tampão TAE 50X

242 g de Tris

57,1 mL ác. Acético glacial

100 mL EDTA 0,5M pH 8,0

1000 mL de água destilada

8.1.8 Tampão TAE 1X

20 mL TAE 50X

980 mL de água destilada

8.1.9 Tampão TBE 5X

54g Tris base

27,5g ácido bórico

20ml EDTA 0,5M

1000 ml água destilada

8.1.10 Tampão de amostra

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

40% (p/v) sacarose em água

8.1.11 Tampão PBS

10 g NaCl

0,025 g KCl

1,4 g Na₂HPO₄

0,3 g KH₂PO₄

Água para completar 1000 ml

8.1.12 Acrilamida 30%

29 g Acrilamida

1,0g bis-acrilamida

100 ml água destilada

8.1.13 Persulfato de amônio

1g persulfato de amônio

10 ml água destilada

8.1.14 Gel de poliacrilamida 8%

8 ml acrilamida 30%

6 ml TBE 5X

280 μ l persulfato de amônio

32 μ l TEMED

16 ml água destilada

8. 1. 15 Soro Albumina Bovina (BSA)

BSA (GIBCO-BRL) foi dissolvida em tampão PBS a uma concentração de 50 mg/ml, alíquotada e estocada à -20°C .

8.1.16 Oligonucleotídeos iniciadores

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

8.1.17 dNTPS (desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

Os dNTPS (GIBCO-BRL) foram diluídos a uma concentração de 2,5 mM cada, em água milliQ e estocados à -20°C .

8.1.18 Proteinase K (fungal)

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

8.1.19 RNase a "I"

A enzima RNase I (Sigma) foi dissolvida numa concentração de 20 mg/ml em 10 mM Tris-HCl pH 7,5 e 15 mM NaCl. A solução foi aquecida à 100°C por 15 min., resfriada à temperatura ambiente, distribuída em alíquotas de 300 μl e estocadas à 20°C .

8.1.20 Acetato de sódio

3M acetato de sódio

Água destilada para completar 1000 ml

pH 5,2 ajustado com ácido acético glacial

8.2 Tabelas com o tamanho aproximado dos fragmentos resultantes da análise das regiões ITS1 e ITS2 com endonucleases de restrição.

8.2.1 Tamanho aproximado dos fragmentos resultantes da análise da região ITS1 com endonucleases de restrição. Os espaços em branco indicam a ausência de clivagem.

Isolados	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hinf</i> I
98003	88,154	143,164	
98004	88,154	109,143	
98006	88,154	109,143	
98007	88,154	143,164	
98010	88,115,154	77,109,143	
98011	88,115,154	109,143	
98012	88,154	143,164	
98013	88,154	109,143	
98014	88,154	143,164	
98017	88,154	143,164	
98018	88,154	143,164	
98019	88,154	109,143	
1992	88,154	109,143	
98021	88,180	109,143	
98022	88,180	143,164	
98023	88,180	109,143	
98025	88,154	143,164	
98026	88,154	143,164	
98028	88,154	109,143	
98029	88,154	109,143	
98030	88,115	77,143,164	
98031	135,154,180	143,177	
98032	88,154	109,143	
98033	88,154	143,164	
98040	88,154	109,143	
98041	88,154	109,143	104,133,224
98042	88,154	109,143	
98043	88,180	109,143	
892	88,154	109,143	
1792	88,154	109,143	
BS6M1	88,180	143,164	
BS9	180	109,143	
BS16M1	88,154	77,143	
BS18M2	88,154	109,143	
BS52M1	88,154	109,143	
CF02-01	88,154	143,164	
104	88,154	143,164	
91	88,115,180	109,143	
B2	88,154	109,143	
A20	88,154	109,143	
1965	115,154,180	143,164	
CS12-13	88,154	109,164	
CS11-10	88,154	109,143	
CS10-04	88,154	143,164	
NRRL5851	88,154,180	109,199	
1978	88,180	143,164	
1972	88,180	77,109,143	

8.2.1 Continuação

CM01-05	88, 180	164, 177	
CV13	115, 154	109, 143	
CV48	115, 154, 180	53, 77, 109, 143	
BO2002	88, 135	109, 143	
D1	154, 180	109, 143	
D2		109, 143	
D3	88, 135	143, 177	
D4		77, 109, 143	
D5		77, 109, 143	
D6	88, 135, 154	109, 143	

8.2.2 Tamanho aproximado dos fragmentos resultantes da análise da região ITS2 com endonucleases de restrição. . Os espaços em branco indicam a ausência de clivagem.

Isolados	<i>Hae</i> III	<i>Hha</i> I	<i>Hind</i> III	<i>Hinf</i> I
98003	67, 148, 197	133, 172, 200	157, 228, 266	91, 109, 128, 142
98004	124, 170, 197	133, 153, 172, 200, 255	186, 207, 228, 266, 286	79, 109, 128, 158
98006	170, 197	133, 183, 200, 237	157, 228, 266	41, 79, 91, 109, 128
98007	148, 197, 239	133, 172, 200, 237	130, 228	79, 109, 128
98010	148, 197, 239	172, 200, 237, 255	130, 253, 286	91, 128, 142
98011	170, 197	133, 172, 183	157, 286, 319	41, 79, 91, 109, 158
98012	148, 197, 239	133, 172, 200, 237	130, 253, 286	91, 109, 142, 158
98013	170, 197	133, 172, 200	130, 228, 266, 319	41, 79, 91, 109, 158
98014	197, 239	133, 172, 183, 200, 237	186, 207, 228, 266, 286	41, 79, 109, 128, 158
98017	148, 197, 260	133, 172, 200, 237	157, 228, 266, 319	41, 79, 109
98018	170, 197	133, 172, 200, 237	157, 266	109, 128
98019	124, 148, 197	133, 172, 200, 237	157, 228, 266	79, 109, 128
1992	170, 217	133, 153, 172, 183	157, 207, 266	41, 79, 109, 158
98021	148, 197	133, 172, 183	157, 286	79, 109, 158
98022	87, 124, 170, 217	133, 172, 183	130, 253	41, 79, 109, 128
98023	87, 148, 197, 239	133, 172, 200	130, 207, 286	91, 128, 142
98025	170, 197	133, 172, 183, 200, 237	157, 286, 319	41, 79, 109, 179, 250
98026	148, 197, 239	133, 183, 200, 237	157, 228, 266	41, 91, 109
98028	87, 170, 197, 239	133, 172, 183, 237	157, 228, 266	91, 109, 128, 142
98029	170, 197	133, 153, 172, 183, 200	157, 228, 266	41, 79, 91, 109, 158
98030	124, 148, 197, 239	133, 172, 200		41, 79, 91, 109, 128, 142, 158
98031	148, 197	153, 183	157, 228, 266	79, 109, 128
98032	124, 170, 197	133, 172, 183, 255	130, 186, 228	41, 91, 109, 128, 142
98033	87,, 148, 170, 239	153, 183	186, 228, 266, 286, 319	79, 109, 128
98040	170, 197	133, 153, 172, 183, 237	157, 228, 319	41, 79, 109, 158
98041	148, 197	133, 172, 183	130, 186, 228	91, 109, 128, 142
98042	170, 197	200, 237	130, 186, 228	79, 109
98043	170, 197	133, 172, 183	130, 186, 228	79, 91, 109, 158
892	170, 197	172, 183, 200, 237, 255	157, 207, 253, 319	41, 79, 109, 158
1792	148, 197	133, 153, 172, 183, 255	157, 207, 253 319	79, 91, 109, 158

8.2.2 Continuação

BS6M1	148, 197	133, 172, 183, 200, 237	157, 266	41, 79, 91, 109, 158
BS9	170, 197	133, 153, 172, 237	157, 207, 253, 286	79, 109
BS16M1	148, 170, 239	133, 172, 200	186, 207, 228, 266, 286, 319	79, 109, 128
BS18M2	124, 170, 197	133, 172, 183, 200	157, 266	79, 91, 128, 250
BS52M1	124, 170, 197	133, 172, 183	157, 266	79, 109, 128, 142, 158
CF02-01	124, 170, 197	133, 172, 183	186, 228, 286	41, 91, 109, 128, 142, 158, 200, 250
104	87, 124, 148, 197	133, 172, 183, 255	157, 286, 319	79, 109
91	148, 197	153, 183	228, 266, 319	41, 79, 91, 109, 142
B2	124, 170, 197	153, 183	157, 228, 286	41, 79, 91, 109, 142
A20	197, 260	133, 172, 183	130, 253	79, 109
1965	148, 197, 239	172, 183, 200	157, 228, 266	41, 79, 109, 158
CS12-13	87, 148, 170, 239	133, 172, 183	157, 228, 266	79, 109
CS11-10	170, 197	183, 237	157, 266	79, 109, 158
CS10-04	148, 197	133, 172, 183, 200, 237	157, 228, 266	79, 109, 158
NRRL5851	67, 148, 197	133, 172, 183, 237, 255	130, 253	79, 109, 179
1978	87, 148, 170, 239	133, 172, 183	186, 228, 266, 286	79, 109, 128
1972	87, 148, 170, 239	133, 172, 200, 237	186, 228, 266, 286, 319	41, 79, 91, 109, 158
CM01-05	170, 197	133, 172, 183, 200, 237	157, 266	79, 109, 128
CV13	124, 148, 197, 239	133, 172, 183	157, 228, 266	41, 79, 91, 109, 158
CV48	148, 197, 217	133, 172, 183	157, 266	41, 91, 109, 128, 142
BO2002	170, 197	133, 153, 172, 183, 200	157, 228, 266	41, 79, 91, 109, 128, 158
D1	148, 197	133, 183, 200, 237	186, 286	79, 109
D2	124, 148, 197	133, 183, 200, 237	186, 266	41, 91, 128, 200
D3	170, 197	133, 183, 200, 237	186, 228, 266	91, 109, 158, 250
D4	124, 148, 197	133, 172, 183	157, 266, 286	109, 142, 200
D5	124, 148, 197	153, 183	186, 228, 266	79, 109, 128
D6	124, 148, 197	133, 172, 183	186, 286	41, 79, 109, 179

8.2.3 Tamanho aproximado dos fragmentos resultantes da análise da região ITS2 com endonucleases de restrição. Os espaços em branco indicam a ausência de clivagem.

Isolados	Rsa I	Msp I	EcoR I
98003	95, 117, 147, 220, 270	48, 65, 147, 180, 199	95, 310, 342
98004	95, 117, 147, 220, 270	48, 65, 147, 180, 199	95, 310, 342
98006	220, 270	65, 132, 166, 180	71, 310
98007	117, 147, 205, 253, 270	132, 180	95, 342
98010	117, 147, 177, 205, 253, 270	132, 166, 180	95, 310, 375
98011	147, 270, 292	132, 166, 199	71, 310
98012	117, 147, 177, 205, 253	132, 180	375
98013	117, 147, 205	132, 166, 180	95, 310, 375
98014	95, 117, 147, 220, 270	48, 65, 147, 180, 199	95, 342
98017	43, 117, 205, 270	132, 180	310, 375
98018	147, 270	132, 180, 199	71, 289
98019	95, 117, 147, 220, 270	132, 180	71, 310
1992	117, 270	132, 166, 199	95, 375
98021	95, 117, 147, 177, 205, 220, 253, 270	132, 166, 199	375
98022	117, 147, 177, 205, 253	132, 166, 199	95, 375
98023	117, 147, 177, 205, 253	132, 180	95, 375
98025	147, 270, 292	132, 166, 199	375
98026	117, 147, 205, 253, 270	132, 166, 180	95, 289
98028	117, 205, 270	132, 180	95, 310, 342
98029	117, 147, 205	48, 65, 147, 180, 199	71, 289
98030	117, 147, 177, 205, 253	132, 180	95, 310, 375
98031	147, 220, 253, 315	132, 180	95, 310
98032	117, 177, 253	132, 166, 199	71, 289, 342
98033	62, 95, 117, 147	48, 65, 147, 180, 199	37, 59, 375
98040	43, 117, 205, 270	132, 166, 199	71, 289
98041	117, 147, 177, 205, 253	102, 132, 166, 180	95, 310, 375
98042	117, 147, 205	102, 132, 166, 180	71, 289
98043	162, 253, 292	132, 166, 199	95, 289
892	117, 270	132, 166, 199	71, 289
1792	117, 253, 270	132, 166, 199	310
BS6M1	117, 205, 292	65, 132, 166, 180	375
BS9	117, 147, 205, 253, 270	132, 166, 199	71, 289
BS16M1	43, 95, 147, 292	48, 65, 147, 180, 199	37, 59, 71, 375
BS18M2	177, 270	65, 132, 166, 180	95, 289
BS52M1	177, 270, 315	102, 132, 180	95, 289
CF02-01	162, 292	132, 166, 199	37, 59, 375
104	117, 253	102, 132, 166, 180	375
91	95, 117, 147, 220, 270	132, 166, 199	59, 95, 342
B2	117, 147, 205	132, 166	71, 95, 289
A20	117, 220, 292	132, 166, 199	71, 375
1965	162	132, 166, 199	95, 289
CS12-13	43, 117, 205, 270	102, 132, 180	95, 289
CS11-10	147, 270	132, 166, 199	375
CS10-04	117, 220, 292	65, 132, 166, 180	95, 375
NRRL5851	117, 253, 292	65, 132, 166, 180	71, 289, 342
1978	43, 117, 205, 270	132, 166, 180	59, 375
1972	62, 95, 117, 147	132, 166, 199	37, 59, 375
CM01-05	162, 253, 292	48, 65, 147, 180, 199	37, 59, 375

8.2.3 Continuação

CV13	117,205, 292	132, 166, 199	71, 375
CV48	95, 117, 147, 220, 270	132, 166, 180	59, 95, 375
BO2002	162, 253	132, 166, 199	310
D1	147, 270	132, 166, 180	71, 310
D2	147, 253, 270	132, 166, 180	375
D3	62, 95, 117, 205	132, 166, 180	
D4	147, 270, 292	132, 166, 199	95, 375
D5	177, 270	132, 166, 180	59, 95, 286
D6	95, 117, 147, 220, 270	102, 132, 166, 180	71, 310, 342